

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-345499

(43)Date of publication of application : 03.12.2002

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
C12N 15/09
G01N 33/53
G01N 33/566

(21)Application number : 2001-161486

(71)Applicant : EIKEN CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 29.05.2001

(72)Inventor : NAGAMINE KENTARO
YOSHINO MANABU**(54) METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID SEQUENCE AND KIT USABLE FOR THE METHOD****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting a target nucleic acid sequence, and further to provide a kit therefor.

SOLUTION: The method comprises mixing and incubating a template polynucleotide capable of forming a loop capable of forming a base pairing when a complementary base sequence is hybridized therewith, and capable of allowing the 3' terminus to form a loop by annealing with itself and to allow the 3' terminus annealed to itself to become the starting point of a complementary chain synthesis by using itself as the template, mixing and incubating one or more kinds of fixed primers capable of providing the starting point of the complementary chain synthesis at the position different from the primer in two or more kinds of primer-extended products capable of providing the starting points of the complementary chain synthesis at different positions in the loop of the template polynucleotide, a DNA polymerase and a substrate, and observing the agglutination reaction accompanied by the amplification reaction of the polynucleotide. The kit is used for the method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-345499
(P2002-345499A)

(43) 公開日 平成14年12月3日 (2002. 12. 3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
	Z N A	33/566	
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566			A
審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 29 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-161486(P2001-161486)

(22) 出願日 平成13年5月29日 (2001. 5. 29)

(71) 出願人 000120456

栄研化学株式会社

東京都文京区本郷1丁目33番8号

(72) 発明者 長嶺 憲太郎

栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学
株式会社・那須工場内

(72) 発明者 吉野 学

栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学
株式会社・那須工場内

(74) 代理人 100102299

弁理士 芳村 武彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列を検出する方法及びその方法に使用するキット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 標的核酸配列の検出方法及びキットの提供。

【解決手段】 相補的な塩基配列がハイブリダイズしたときに塩基対合可能なループを形成し、3'末端が自身にアニールしてループを形成し自身にアニールした3'末端は自身を鋳型とする相補鎖合成の起点となることができる鋳型ポリヌクレチド、鋳型ポリヌクレチドのループにおいて異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができる2種類以上のプライマー伸長生成物において前記プライマーとは異なる位置に相補鎖ごうせいの起点を与える1種類以上の固定プライマー、DNAポリメラーゼ及び基質を混合してインキュベートし、ポリヌクレチドの増幅反応に伴う凝集反応を観察する方法。さらに前記方法に使用するキット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の要素〔1〕～〔5〕を混合してインキュベートし、ポリヌクレオチドの増幅反応に伴う凝集反応の有無を観察することを特徴とする、試料中の標的核酸配列を検出する方法。

〔1〕：次の条件(a)～(d)を持つ鋳型ポリヌクレオチド、(a)少なくとも1組の相補的な塩基配列からなる標的塩基配列を有する、(b) (a)の相補的な塩基配列がハイブリダイズしたときに、塩基対結合が可能なループを形成することができる、(c)3'末端が自身にアニールしてループを形成することができる、(d)自身にアニールした3'末端は自身を鋳型とする相補鎖合成の起点となることができる〔2〕：鋳型ポリヌクレオチドのループにおいて、異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができる少なくとも2種類のプライマー、〔3〕：鋳型ポリヌクレオチド、および／または鋳型ポリヌクレオチドに〔2〕のプライマーがアニールして生成する伸長生成物において、〔2〕のプライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができる少なくとも1種類のプライマーであって、5'末端を不溶性担体に固定化したもの(固定プライマー)、〔4〕：鎖置換を伴う相補鎖合成を触媒することができるDNAポリメラーゼ、

〔5〕：相補鎖合成のための基質、

【請求項2】前記固定プライマー〔3〕が、鋳型ポリヌクレオチド、および／または鋳型ポリヌクレオチドに〔2〕のプライマーがアニールして生成する伸長生成物が形成するループにおいて、〔2〕のプライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができるプライマー(固定ループプライマー)であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】不溶性担体が天然高分子担体、合成高分子担体、金属コロイド、または磁性粒子である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】不溶性担体が合成高分子担体のラテックスであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】鋳型ポリヌクレオチドが、自身の塩基配列の任意の領域に対して相補的な塩基配列をその5'末端に備えている請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】次の工程によって鋳型ポリヌクレオチドを生成する請求項1～5のいずれかに記載の方法。

a) 標的塩基配列に第1のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程；ここで第1のプライマーはその3'末端において標的塩基配列を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができ、かつ第1のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

b) 工程a)で合成された第1のプライマーを起点とする伸長生成物における第2のプライマーがアニールすべ

き領域を塩基対結合が可能な状態とする工程；ここで第2のプライマーはその3'末端において前記第1のプライマーを起点とする伸長生成物における標的塩基配列の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができる塩基配列を備え、かつ第2のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

c) 工程b)において塩基対結合が可能となった領域に第2のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成を行う工程、

d) 工程c)によって合成された第2のプライマーを起点とする伸長生成物の3'末端を自身にアニールさせて、自身を鋳型とする相補鎖合成を行う工程

【請求項7】前記2種類のプライマー〔2〕が、第1のプライマー、および第2のプライマーである請求項6に記載の方法。

【請求項8】前記固定プライマー〔3〕が、第1のプライマーを起点とする伸長生成物における第1のプライマーに由来する領域と、第1のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第1の固定プライマー；および／または第2のプライマーを起点とする伸長生成物における第2のプライマーに由来する領域と、第2のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第2の固定プライマーを含むものである請求項7に記載の方法。

【請求項9】工程b)および／または工程c)において、第1のプライマーまたは第2のプライマーに対してその上流に相補鎖合成の起点を与えるアウタープライマーからの相補鎖合成によって、第1のプライマーおよび／または第2のプライマーを起点とする伸長生成物を置換して第1のプライマーまたは第2のプライマーを起点とする各生成物を1本鎖とする請求項4に記載の方法。

【請求項10】工程a)において、標的塩基配列が2本鎖ポリヌクレオチドとして存在しており、第1のプライマーがアニールする領域が、任意のプライマーを起点とする相補鎖合成反応によって塩基対結合が可能な状態とされる請求項4に記載の方法。

【請求項11】工程a)を融解温度調整剤の存在下で行う請求項10に記載の方法。

【請求項12】融解温度調整剤が、ベタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド、およびトリメチルアミンN-オキシドから選択される少なくとも1つの化合物である請求項11に記載の方法。

【請求項13】ピロリン酸塩形成抑制剤の存在下にポリヌクレオチドの増幅反応を行う請求項1～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】ピロリン酸塩形成抑制剤がPyrophosphataseである請求項13に記載の方法。

【請求項15】請求項1～14のいずれかに記載の方法によって標的塩基配列における変異を検出する方法であって、標的塩基配列が予測された塩基配列でなかったときに、前記増幅方法を構成する相補鎖合成反応から選択される少なくとも1つの相補鎖合成反応が妨げられるものであり、前記増幅反応に伴う凝集反応が生じたかどうかを観察し、凝集反応が生じなかったときに標的塩基配列が予測した塩基配列でないと判定する工程を含む方法。

【請求項16】請求項1～14のいずれかに記載の方法によって標的塩基配列における変異を検出する方法であって、前記増幅反応に伴う凝集反応が生じたかどうかを観察し、凝集反応が生じたときに標的塩基配列が予測した塩基配列であると判定する工程を含む方法。

【請求項17】次の要素を含む、標的塩基配列の検出用キット。

- a) 第1のプライマー；ここで第1のプライマーはその3'末端において標的塩基配列を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができ、かつ第1のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、
- b) 第2のプライマー；ここで第2のプライマーはその3'末端において前記第1のプライマーを起点とする伸長生成物における標的塩基配列の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができる塩基配列を備え、かつ第2のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、
- c) 少なくとも1種類の5'末端を不溶性担体に固定した固定プライマー；ここで該固定プライマーは、第1のプライマー、または第2のプライマーを起点とする伸長生成物において、各プライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができるものである、
- d) 鎖置換を伴う相補鎖合成を触媒することができるDNAポリメラーゼ、
- e) 相補鎖合成のための基質、
- f) ピロリン酸塩形成抑制剤、

【請求項18】固定プライマーが、鋳型ポリヌクレオチド、および／または鋳型ポリヌクレオチドに第1のプライマーまたは第2のプライマーがアニールして生成する伸長生成物が形成するループにおいて、各プライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができるプライマー(固定ループプライマー)であることを特徴とする請求項17に記載のキット。

【請求項19】前記固定プライマーc)が、第1のプライマーを起点とする伸長生成物における第1のプライマーに由来する領域と、第1のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第1の固定プライマー；および第2のプライマー

を起点とする伸長生成物における第2のプライマーに由来する領域と、第2のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第2の固定プライマーを含むものである請求項17または18に記載のキット。

【請求項20】更に次の要素g)を含む請求項17～19のいずれかに記載のキット。

g) アウタプライマー；アウタープライマーは、第1のプライマーおよび／または第2のプライマーの上流に相補鎖合成の起点を与えることができる

【請求項21】ピロリン酸塩形成抑制剤がPyrophosphataseである請求項17～20のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸配列の検出方法及び該方法に使用する標的塩基配列の検出用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】ゲノムドラフトが明らかにされ、時代はポストシーケンスへと移りつつある。SNPsのような遺伝子の機能解析や、その解析結果に基づく遺伝子診断の必要性がますます高まっている。遺伝子の塩基配列をより正確に、より迅速に解析することができる技術の開発は、機能解析を迅速に進めるために、また遺伝子の機能解析の成果を実際の医療の現場で実用化するうえで、重要な課題となっている。

【0003】PCR(Polymerase Chain Reaction)法による鋳型依存的な核酸の合成方法は、近年の生命科学分野における研究の大きな推進力となった。PCR法は、少量の2本鎖核酸を鋳型として、鋳型に対して相補的な塩基配列で構成される核酸の指数関数的な増幅を可能とした。いまやPCR法は、遺伝子のクローニングや検出のための道具として、広く普及している。PCR法では、目的とする塩基配列の両端に対して相補的な塩基配列からなる1組のプライマーが用いられる。一方のプライマーによってもたらされる伸長生成物には、他方のプライマーがアニールするように設計される。こうして、互いの伸長生成物へのアニールと相補鎖合成が繰り返行われる合成反応が進み、指数関数的な増幅が達成される。

【0004】PCR法においては、複雑な温度制御が不可欠である。複雑な温度制御に対応するには、専用の反応装置を使わなければならない。したがって、ベッドサイドや野外でPCRを実施することは困難である。また、反応特異性の向上も、公知の相補鎖合成反応の重要な課題であった。たとえばPCR法では、相補鎖合成産物が新たな鋳型として用いられるとき、プライマーがアニールする領域は、厳密には試料に由来する塩基配列ではなくプライマーの塩基配列を写し取ったものに過ぎない。

したがって、PCR用のプライマーを利用してわずかな塩基配列の相違を認識するのは、一般には困難とされている。

【0005】これらの課題を解決するための1つの方法として、本発明者らは、LAMP法(Loop-mediated isothermal amplification)を完成している(Nucleic Acid Res. 2000 Vol.28 No.12 e63, WO 00/28082)。LAMP法は、鋳型ポリヌクレオチドに自身の3'末端をアニールさせて相補鎖合成の起点とするとともに、このとき形成されるループにアニールするプライマーを組み合わせるることによって等温での相補鎖合成反応を可能とした。またLAMP法では、3'末端が常に試料に由来する領域に対してアニールするために、塩基配列のチェック機構が繰り返し機能する。その結果、わずかな塩基配列の判別が可能となった。

【0006】LAMP法やPCR法のような相補鎖合成反応に基づいて、標的塩基配列の検出を行う場合、その反応に要する時間と、検出感度との間には密接な関係がある。つまり、反応がプラトーに達するまでは、できるだけ長い時間反応させることが、高い検出感度を達成するための条件となる。LAMP法やPCR法のような公知の相補鎖合成反応は、1時間前後で反応がプラトーに達する。つまり、最大の感度を得るためには1時間前後の反応時間を要すると言って良い。1時間は、反応時間としてはそれほど長いものではないが、もしも検出感度や操作性を犠牲にすることなく、より短い反応時間を実現することができれば有用である。

【0007】核酸の増幅法によって得られた増幅産物の検出は、核酸反応混合物をゲル電気泳動で展開し、増幅産物と、鋳型核酸やプライマー等の非検出対象成分とを分離した状態で、蛍光染色によって増幅産物のバンドをその分子量などから判断して特定してから、そのバンドの蛍光強度を測定することにより行われてきた。

【0008】しかしながら、核酸の増幅法を用いた核酸の検出においては、反応溶液中に鋳型核酸と大過剰なプライマー等が含まれており、増幅対象の核酸配列の種類によっては、非検出対象成分と増幅産物とのゲル電気泳動による分離操作が困難な場合も多い。また、検体数が多くなると、煩雑なゲル電気泳動を行うことが多大な労力と時間の浪費を伴うことになり、効率良い検出操作を行う上での障害となっていた。特に臨床等における遺伝子解析においては、多くの検体をより短時間で効率良く処理できることが要求され、従来の方法ではこのような要求には十分対応できるものではないという問題があった。

【0009】上記問題を解決するために、より簡便な核酸増幅産物検出方法の開発が試みられてきた。特開平9-168400には核酸増幅反応に用いるプライマーを不溶性担体に固定化、もしくは固定可能な状態にしておき、核酸増幅産物を凝集反応により検出する方法が記載

されている。

【0010】特開平9-168400ではPCRにより核酸を増幅しているが、PCRにより増幅産物を検出するためには、2種類のプライマーを固定化、もしくは固定化可能な状態にしておく必要がある。また、不溶性担体に固定化したプライマーを用いてPCRを行った場合、PCR特有の温度サイクルに伴って核酸増幅産物は凝集と分散を繰り返すことになるので、凝集反応により核酸増幅反応をリアルタイムにモニタリングするには適さない。このように、1種類の固定化プライマーで核酸増幅産物を凝集し検出する方法や、核酸増幅反応を凝集反応によりリアルタイムにモニタリングする方法は未だ知られていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、ポリヌクレオチドを鋳型として用いるポリヌクレオチドの増幅反応に伴う凝集反応の有無を観察することによって、試料中の標的核酸配列を迅速に検出する方法の提供である。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するために相補鎖合成の条件について研究を重ねた。そして、相補鎖合成に用いるプライマーと、相補鎖合成の起点となる3'末端との組み合わせが、相補鎖合成の反応速度と密接に関連していることを見出した。更に、特定の構造を持った鋳型ポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドの特定の位置で相補鎖合成の起点を与えることができる不溶性担体に固定したプライマーを組み合わせるることによって、相補鎖合成の反応効率を改善するとともにポリヌクレオチドの増幅反応に伴い凝集反応が生じることを発見し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の核酸配列を検出する方法、ならびにその方法に使用する検出用キットに関する。

【0013】1. 以下の要素〔1〕～〔5〕を混合してインキュベートし、ポリヌクレオチドの増幅反応に伴う凝集反応の有無を観察することを特徴とする、試料中の標的核酸配列を検出する方法。

〔1〕：次の条件(a)～(d)を持つ鋳型ポリヌクレオチド、(a)少なくとも1組の相補的な塩基配列からなる標的塩基配列を有する、(b) (a)の相補的な塩基配列がハイブリダイズしたときに、塩基対結合が可能なループを形成することができる、(c)3'末端が自身にアニールしてループを形成することができる、(d)自身にアニールした3'末端は自身を鋳型とする相補鎖合成の起点となることができる

〔2〕：鋳型ポリヌクレオチドのループにおいて、異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができる少なくとも2種類のプライマー、

〔3〕：鋳型ポリヌクレオチド、および/または鋳型ポリヌクレオチドに〔2〕のプライマーがアニールして生

成する伸長生成物において、〔２〕のプライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができる少なくとも１種類のプライマーであって、５'末端を不溶性担体に固定化したもの（固定プライマー）、

〔４〕：鎖置換を伴う相補鎖合成を触媒することができるDNAポリメラーゼ、

〔５〕：相補鎖合成のための基質、

２．前記固定プライマー〔３〕が、鋳型ポリヌクレオチド、および／または鋳型ポリヌクレオチドに〔２〕のプライマーがアニールして生成する伸長生成物が形成するループにおいて、〔２〕のプライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができるプライマー（固定ループプライマー）であることを特徴とする１に記載の方法。

３．不溶性担体が天然高分子担体、合成高分子担体、金属コロイド、または磁性粒子である１または２に記載の方法。

４．不溶性担体が合成高分子担体のラテックスであることを特徴とする３に記載の方法。

５．鋳型ポリヌクレオチドが、自身の塩基配列の任意の領域に対して相補的な塩基配列をその５'末端に備えている１～４のいずれかに記載の方法。

６．次の工程によって鋳型ポリヌクレオチドを生成する１～５のいずれかに記載の方法。

ａ）標的塩基配列に第１のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程；ここで第１のプライマーはその３'末端において標的塩基配列を構成する一方の鎖の３'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができ、かつ第１のプライマーの５'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

ｂ）工程ａ）で合成された第１のプライマーを起点とする伸長生成物における第２のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程；ここで第２のプライマーはその３'末端において前記第１のプライマーを起点とする伸長生成物における標的塩基配列の３'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができる塩基配列を備え、かつ第２のプライマーの５'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

ｃ）工程ｂ）において塩基対結合が可能となった領域に第２のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成を行う工程、

ｄ）工程ｃ）によって合成された第２のプライマーを起点とする伸長生成物の３'末端を自身にアニールさせて、自身を鋳型とする相補鎖合成を行う工程

７．前記２種類のプライマー〔２〕が、第１のプライマー、および第２のプライマーである６に記載の方法。

８．前記固定プライマー〔３〕が、第１のプライマーを起点とする伸長生成物における第１のプライマーに由来する領域と、第１のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第１の固定プライマー；および／または第２のプライマーを起点とする伸長生成物における第２のプライマーに由来する領域と、第２のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第２の固定プライマーを含むものである７に記載の方法。

９．工程ｂ）および／または工程ｃ）において、第１のプライマーまたは第２のプライマーに対してその上流に相補鎖合成の起点を与えるアウタープライマーからの相補鎖合成によって、第１のプライマーおよび／または第２のプライマーを起点とする伸長生成物を置換して第１のプライマーまたは第２のプライマーを起点とする各生成物を１本鎖とする４に記載の方法。

１０．工程ａ）において、標的塩基配列が２本鎖ポリヌクレオチドとして存在しており、第１のプライマーがアニールする領域が、任意のプライマーを起点とする相補鎖合成反応によって塩基対結合が可能な状態とされる４に記載の方法。

１１．工程ａ）を融解温度調整剤の存在下で行う１０に記載の方法。

１２．融解温度調整剤が、ベタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド、およびトリメチルアミンＮ-オキシドから選択される少なくとも１つの化合物である１１に記載の方法。

１３．ピロリン酸塩形成抑制剤の存在下にポリヌクレオチドの増幅反応を行う１～１２のいずれかに記載の方法。

１４．ピロリン酸塩形成抑制剤がPyrophosphataseである１３に記載の方法。

１５．１～１４のいずれかに記載の方法によって標的塩基配列における変異を検出する方法であって、標的塩基配列が予測された塩基配列でなかったときに、前記増幅方法を構成する相補鎖合成反応から選択される少なくとも１つの相補鎖合成反応が妨げられるものであり、前記増幅反応に伴う凝集反応が生じたかどうかを観察し、凝集反応が生じなかったときに標的塩基配列が予測した塩基配列でないと判定する工程を含む方法。

１６．１～１４のいずれかに記載の方法によって標的塩基配列における変異を検出する方法であって、前記増幅反応に伴う凝集反応が生じたかどうかを観察し、凝集反応が生じたときに標的塩基配列が予測した塩基配列であると判定する工程を含む方法。

１７．次の要素を含む、標的塩基配列の検出用キット。

ａ）第１のプライマー；ここで第１のプライマーはその３'末端において標的塩基配列を構成する一方の鎖の３'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることがで

き、かつ第1のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

b) 第2のプライマー；ここで第2のプライマーはその3'末端において前記第1のプライマーを起点とする伸長生成物における標的塩基配列の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができる塩基配列を備え、かつ第2のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

c) 少なくとも1種類の5'末端を不溶性担体に固定した固定プライマー；ここで該固定プライマーは、第1のプライマー、または第2のプライマーを起点とする伸長生成物において、各プライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができるものである、

d) 鎖置換を伴う相補鎖合成を触媒することができるDNAポリメラーゼ、

e) 相補鎖合成のための基質、

f) ピロリン酸塩形成抑制剤、

18. 固定プライマーが、鋳型ポリヌクレオチド、および/または鋳型ポリヌクレオチドに第1のプライマーまたは第2のプライマーがアニールして生成する伸長生成物が形成するループにおいて、各プライマーとは異なる位置に相補鎖合成の起点を与えることができるプライマー(固定ループプライマー)であることを特徴とする17に記載のキット、

19. 前記固定プライマーc)が、第1のプライマーを起点とする伸長生成物における第1のプライマーに由来する領域と、第1のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第1の固定プライマー；および第2のプライマーを起点とする伸長生成物における第2のプライマーに由来する領域と、第2のプライマーに対する前記任意の領域の間において相補鎖合成の起点を与えることができる第2の固定プライマーを含むものである17または18に記載のキット、

20. 更に次の要素g)を含む17~19のいずれかに記載のキット、

g) アウタープライマー；アウタープライマーは、第1のプライマーおよび/または第2のプライマーの上流に相補鎖合成の起点を与えることができる

21. ピロリン酸塩形成抑制剤がPyrophosphataseである17~20のいずれかに記載のキット、

【0014】

【発明の実施の形態】本発明は、特定構造の鋳型ポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドの特定の領域に相補鎖合成の起点を与えることができる、5'末端を不溶性担体に固定したプライマーを組み合わせることによって、迅速な相補鎖合成を可能とするとともに、ポリヌクレオチドの増幅反応に伴う凝集反応の有無を観察するこ

とによって、試料中の標的核酸配列を迅速に検出することを可能とした。まず本発明に用いる鋳型ポリヌクレオチドは、次の構造を有する。

(a) 少なくとも1組の相補的な塩基配列からなる標的塩基配列を有する、(b) (a)の相補的な塩基配列がハイブリダイズしたときに、塩基対結合が可能なループを形成することができる、(c) 3'末端が自身にアニールしてループを形成することができる、(d) 自身にアニールした3'末端は自身を鋳型とする相補鎖合成の起点となることができる、

【0015】本発明において、ポリヌクレオチドとは、DNA、またはRNA、あるいはそれらのキメラ分子であることができる。ポリヌクレオチドは、天然のものであることもできるし、人工的に合成されたものであることもできる。また部分的に、あるいは全体が完全に人工的な構造からなるヌクレオチド誘導体であっても、それが塩基対結合を形成しうるものであり、かつ必要に応じて相補鎖合成の鋳型とすることが可能であるかぎり本発明のポリヌクレオチドに含まれる。このような分子としては、たとえばペプチド結合によってバックボーンが形成されているPNAなどを示すことができる。本発明におけるポリヌクレオチドの構成塩基数は、制限されない。ポリヌクレオチドは、用語「核酸」と同義である。一方、本発明におけるオリゴヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドの中でも特に構成塩基数が少ないものを示す用語として用いる。一般にオリゴヌクレオチドは、2~100、より一般的には、2~50程度の塩基数のポリヌクレオチドを指してオリゴヌクレオチドと呼ぶが、これらの数値に限定されるものではない。

【0016】本発明において標的塩基配列とは、合成すべきポリヌクレオチドの塩基配列を意味する。一般にポリヌクレオチドの塩基配列は、5'側から3'側に向けてセンス鎖の塩基配列を記載する。本発明における標的塩基配列とは、センス鎖の塩基配列に加えて、その相補鎖、すなわちアンチセンス鎖の塩基配列も含む。すなわち、用語「標的塩基配列」とは、合成すべき塩基配列、およびその相補鎖の少なくともいずれかを意味する用語として用いる。なお本発明はポリヌクレオチドの合成、増幅のみならず標的塩基配列の検出をも可能とする方法を提供する。本発明に基づいてポリヌクレオチドの増幅を行う場合には、増幅すべき塩基配列を標的塩基配列と呼ぶ。標的塩基配列は、長いポリヌクレオチドの中から選択された任意の連続した塩基配列であることもできるし、あるいは1本鎖や環状のポリヌクレオチドの全長を標的塩基配列とすることもできる。なお合成(synthesis)とは1つの標的塩基配列を少なくとも2倍以上に増やす行為を意味する。一方、合成された標的塩基配列に基づいて、連続的に新たな標的塩基配列が合成されるとき、特に増幅(amplification)と呼ぶ。増幅とは、合成が連続的に行われること、と言うこともできる。更に本

発明において、相補鎖合成の起点を与えることとは、鋳型となるポリヌクレオチドに対して、相補鎖合成に必要なプライマーとして機能するポリヌクレオチドの3'末端をハイブリダイズさせることを言う。特定の領域において相補鎖合成の起点を与えると言うときは、当該領域の中の任意の位置に相補鎖合成の起点となる3'末端が位置するように、ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせることを意味する。このとき、3'末端が目的とする領域に位置する限り、ハイブリダイズに必要な塩基配列の一部をその領域の外に配置することもできる。また本発明において、3'末端、あるいは5'末端:3'末端、あるいは5'末端とは、単にいずれかの末端の1塩基のみならず、末端の1塩基を含み、かつ末端に位置する領域を意味する。より具体的には、いずれかの末端から500塩基、望ましくは100塩基、あるいは少なくとも20塩基は、3'末端、あるいは5'末端に含まれる。これに対して、末端の1塩基や末端付近に存在する特定の位置の塩基を示すためには、その位置を数値で特定することによって示すものとする。

【0017】本発明の標的塩基配列は少なくとも1組の相補的な塩基配列からなっている。本発明において同一、あるいは相補的という用語は、いずれも完全に同一でない場合、あるいは完全に相補的でない場合を含む。すなわち、ある配列と同一とは、ある配列に対してアニールすることができる塩基配列に対して相補的な配列をも含むことができる。他方、相補的とは、ストリンジェントな条件下でアニールすることができ、相補鎖合成の起点となる3'末端を提供することができる配列を意味する。具体的には、ある塩基配列に対して、一般に50-100%、通常は70-100%、好ましくは80-100%の同一性を有する塩基配列は、実質的に同一と言うことができる。同一性はBLASTN等の公知のアルゴリズムに基づいて決定することができる。

【0018】本発明の鋳型ポリヌクレオチドは、前記相補的な塩基配列がハイブリダイズしたときに、ループを形成することができる。相補的な塩基配列はハイブリダイズした後は、塩基対結合が安定に維持される条件のもとでは、もはや新たな塩基対結合を生じることが困難である。一方ループは、このループを構成する塩基配列に相補的な塩基配列からなる別のポリヌクレオチドと新たな塩基対結合を形成することができる。ループを構成する塩基配列は任意である。

【0019】本発明において用いられるハイブリダイズという用語は、相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドが塩基対結合によって結合することを意味する。塩基対結合するポリヌクレオチドは別の分子であることもできるし、同一の分子であることもできる。異なる分子間で生じたハイブリダイズを解消すれば、複数のポリヌクレオチド分子に解離する。一方、同一の分子上でハイブリダイズしたポリヌクレオチドは、塩基対結合を解消

しても1分子のポリヌクレオチドのままである。本発明においては、アニールという用語も用いられる。ポリヌクレオチドが相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドにハイブリダイズして相補鎖合成の起点となる3'末端を与え、特にアニールと表現する場合がある。

【0020】本発明の鋳型ポリヌクレオチドは、その3'末端が自身にアニールしてループを形成することができる。更に自身にアニールした3'末端は自身を鋳型とする相補鎖合成の起点となることができる。アニールするための塩基配列は、その3'末端からの相補鎖合成を可能とする限り制限されない。具体的には、たとえばポリヌクレオチドの3'から100-200塩基、通常50-80塩基、望ましくは20-30塩基が前記標的塩基配列中の任意の領域に対して相補的な塩基配列を有する。このとき、アニールした3'末端の塩基は、標的塩基配列に対して完全に相補的であることが望ましい。3'末端の塩基が完全に相補的であることは、必須ではないが、効率的な相補鎖合成の重要な条件である。本発明の鋳型ポリヌクレオチドは、3'末端の自身へのアニールによって、ループを形成することができる。ループは前記ループと同様に、任意の塩基配列からなり、他のポリヌクレオチドと塩基対結合が可能な状態で存在する。

【0021】また本発明の鋳型ポリヌクレオチドは、その5'末端において、自身が有する任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えることができる。このような鋳型ポリヌクレオチドの相補鎖が合成されると、合成された新たなポリヌクレオチドの3'末端は、自身の任意の領域に対してアニールして、自身を鋳型とする相補鎖合成反応の起点となることができる。3'末端が自身にアニールすることによって、ループが形成される。こうして形成されるループには、本発明におけるプライマーがアニールすることができる。このように、鋳型ポリヌクレオチドの5'末端を、自身が有する任意の領域に対して相補的な塩基配列とすることによって、相補鎖合成の生成物を再び鋳型ポリヌクレオチドとして利用することができる。したがって、このような鋳型ポリヌクレオチドは、本発明において、高度に効率的な相補鎖合成反応を達成するための望ましい構造である。

【0022】本発明における鋳型ポリヌクレオチドは、酵素的に、あるいは化学的に合成することができる。たとえば、以下の工程a)-d)を経て鋳型ポリヌクレオチドを合成することができる。以下の工程a)-d)は、LAMP法を利用したポリヌクレオチドの合成方法と言うことができる。

a) 標的塩基配列に第1のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程；ここで第1のプライマーはその3'末端において標的塩基配列を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができ、かつ第1のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物

の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

b) 工程a) で合成された第1のプライマーを起点とする伸長生成物における第2のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程；ここで第2のプライマーはその3'末端において前記第1のプライマーを起点とする伸長生成物における標的塩基配列の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができる塩基配列を備え、かつ第2のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである、

c) 工程b) において塩基対結合が可能となった領域に第2のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成を行う工程、

d) 工程c) によって合成された第2のプライマーを起点とする伸長生成物の3'末端を自身にアニールさせて、自身を鋳型とする相補鎖合成を行う工程。

【0023】上記工程を図1に基づいてより具体的に説明する。以下の説明では、仮にR2およびR1cからなる第1のプライマー(RA)、ならびにF2およびF1cからなる第2のプライマー(FA)を用いて、本発明における鋳型ポリヌクレオチドを生成する行程を例示する。以下の説明においては、第1のプライマーおよび第2のプライマーを、それぞれ仮にRAおよびFAと名づける。第1のプライマーRAは、その3'末端において標的塩基配列を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができ、かつ第1のプライマーRAの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備える。RAの3'側の領域をR2、5'側の領域をR1cと称する。一方、第2のプライマーFAは、その3'末端において前記第1のプライマーRAを起点とする伸長生成物における標的塩基配列の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができる塩基配列を備え、かつ第2のプライマーFAの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備える。FAの3'側はF2、5'側はF1cと称する。更にRAとFAの3'側と5'側を構成する各領域は、それぞれ次のような領域に対して相補的な塩基配列からなっている。

RAの3'側(R2) : R2c

RAの5'側(R1c) : R1

FAの3'側(F2) : F2c

FAの5'側(F1c) : F1

【0024】結局、RAは標的塩基配列のR2cとR1によって、またFAは標的塩基配列におけるF2cとF1によってその構造が決定されることになる。したがって本発明においては、標的塩基配列は、少なくともその一部の塩基配列が明らかとなっている、あるいは推測が

可能な状態にある塩基配列であることが求められる。塩基配列を明らかにすべき部分とは、RAとFAの構造を決定する各領域、あるいはその相補的な塩基配列からなる領域である。R2cとR1c(またはF2cとF1c)は、連続する場合、そして離れて存在する場合とを想定することができる。両者の相対的な位置関係により、生成物であるポリヌクレオチドが自己アニールしたときに形成されるループ部分の状態が決定される。本発明において、自己アニールとは、1本鎖ポリヌクレオチドの3'末端を含む領域が、そのポリヌクレオチド自身の相補的な塩基配列にハイブリダイズして、自身を鋳型とする相補鎖合成の起点となることを意味する。生成物であるポリヌクレオチドが分子間のアニールではなく自己アニールを優先的に行うためには、両者の距離が不必要に離れないほうが望ましい。したがって、両者の位置関係は、通常0-500塩基分の距離を介して連続するようにするのが望ましい。ただし、後に述べる自己アニールによるループの形成において、両者があまりにも接近している場合には望ましい状態のループの形成を行うには不利となるケースも予想される。

【0025】ループにおいては、新たなオリゴヌクレオチドのアニールと、それを合成起点とする鎖置換を伴う相補鎖合成反応がスムーズに開始できる構造が求められる。したがってより望ましくは、領域R2cおよびその5'側に位置する領域R1cとの距離が、0-100塩基、さらに望ましくは10-70塩基となるように設計する。なおこの数値はR1cとR2cを含まない長さを示している。ループ部分を構成する塩基数は、更にR2に相当する領域を加えた長さとなる。なお同様の条件がFAにおけるF2cとF1cにも適用される。

【0026】上記標的塩基配列に対してRAおよびFAを構成する領域R2とR1c(またはF2とF1c)は、通常は重複することなく連続して配置される。あるいはもしも両者の塩基配列に共通の部分があるのであれば、部分的に両者を重ねて配置することもできる。R2(またはF2)はプライマーとして機能する必要があることから、常に3'末端となるようにしなければならない。一方R1c(またはF1c)は、後に述べるように、これを鋳型として合成された相補鎖の3'末端にプライマーとしての機能を与える必要があることから、5'末端に配置する。このオリゴヌクレオチドを合成起点として得られる相補鎖は、次のステップにおいては逆向きからの相補鎖合成の鋳型となり、最終的にはRAとFAも鋳型として相補鎖に写し取られる。写し取られることによって生じる3'末端は塩基配列R1(またはF1)を備えており、同一鎖上のR1c(またはF1c)にアニールするとともに、ループを形成する。

【0027】まず1本鎖とされた標的塩基配列におけるR2cに第1のプライマーのR2がアニールし、相補鎖合成が行われる[図1-(1)]。第1のプライマーを

起点とする伸長生成物を、例えばアウタープライマーR3を使用して鎖置換伸長反応を行うことによって1本鎖とし〔図1-(2)〕、そのF2cに第2のプライマーのF2をアニールさせて相補鎖合成を行うと〔図1-(3)〕、相補鎖合成は第1のプライマーの5'末端に達したところで終了する。このとき合成される第2のプライマーを起点とする伸長生成物は、その3'末端にR1を備えている〔図1-(4)〕。3'末端のR1は、第1のプライマーの5'側R1cを鋳型として合成された領域である。第2のプライマーを起点とする伸長生成物を、例えばアウタープライマーF3を使用して鎖置換伸長反応を行うことによって、両端にループを有する第1のポリヌクレオチド (basic dumbbell form 1) が得られる〔図1-(5)〕。このポリヌクレオチドでは、R1は自身のR1cにアニールして相補鎖合成の起点となり、自身を鋳型とする相補鎖合成が行われる〔図2-(6)〕。以上の反応を経て生成されるポリヌクレオチドは、標的塩基配列とその相補鎖からなる1組の相補的な塩基配列を備え、それがハイブリダイズしたときには塩基対結合が可能なループを形成する。加えて、その3'末端には、自身のF1cに相補的な塩基配列からなるF1を備えている。F1は第2のプライマーのF1cを鋳型として合成された領域である。すなわち、この生成物は本発明における鋳型ポリヌクレオチドに他ならない。

【0028】この生成物のループには、第1のプライマーRAのR2がアニールし、鎖置換反応を伴う相補鎖合成が行われる。そして、鎖置換によって1本鎖とされた3'末端のF1は自身のF1cにアニールしてループを形成するとともに、相補鎖合成の起点となり、自身を鋳型とする相補鎖合成が行われる。〔図2-(7)〕このF1を起点とする鎖置換伸長反応によって、図2-

(8)のループを有する鎖伸長生成物が得られるとともに、前記ループにアニールした第1のプライマーを起点とする伸長生成物が置換されて、両端にループを有する第2のポリヌクレオチド (basic dumbbell form 2) が得られる。〔図2-(5')〕

【0029】そして、このbasic dumbbell form 2においてもbasic dumbbell form 1と同様に、F1が自身のF1cにアニールして相補鎖合成の起点となり、自身を鋳型とする相補鎖合成反応〔図2-(5')〕、ループへの第2のプライマーFAのアニールと鎖置換伸長反応〔図2-(6')〕、および1本鎖とされた3'末端のR1のR1cへのアニールと自身を鋳型とする相補鎖合成反応が行われ、図2-(8')のループを有する鎖伸長生成物とともに図2-(5)のbasic dumbbell form 1が得られる。

【0030】なお、図2-(8)において標的塩基配列を構成しているのは、F2とR2cの間、ならびにその相補的な塩基鎖であるR2とF2cの間を構成する塩基

配列である。図1における(1)~(5)の反応は、実際には標的塩基配列の相補鎖においても平行して進行し、第2のプライマーFAの相補鎖合成から始まって、図2-(5')の両端にループを有する第2のポリヌクレオチド (basic dumbbell form 2) が得られる。

【0031】次に、LAMP法に基づいて鋳型ポリヌクレオチドを合成するための反応における工程b)、すなわち工程a)で合成された第1のプライマーを起点とする伸長生成物における第2のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合が可能な状態とする工程を行うには、アウタープライマーの利用が有利である。本発明において、アウタープライマーとは、標的塩基配列に対してアニールする第1のプライマーおよび第2のプライマーより上流に対して相補的な塩基配列からなるプライマーである。本発明において、上流とは、鋳型における3'側を意味する。したがってアウタープライマーがアニールするのは、第1のプライマーおよび第2のプライマーから見れば5'側の領域となる。

【0032】例えば図1-(2)においては、RAがアニールする領域R2cの3'側に位置するR3cにアニールするアウタープライマーR3が記載されている。同様にその相補鎖においては、FAがアニールする領域の3'側に位置するF3cに対してアウタープライマーF3をアニールさせることができる〔図1-(4)〕。アウタープライマーは、プライマーとして機能する塩基配列を少なくともその3'側に備えるオリゴヌクレオチドを用いることができる。第1のプライマーおよび第2のプライマー2種は、本発明における3種のプライマーのうちの2種として用いることができる。一方ここで述べたアウタープライマーは、必ずしも本発明の3種のプライマーを構成しなくても良い。アウタープライマーは、鋳型ポリヌクレオチドの合成のために用いられる。

【0033】第1のプライマーおよび第2のプライマーが通常2つのプライマーの組み合わせで構成されるのに対して、アウタープライマーは、任意の数であることができる。本発明において、一般的なアウタープライマーは、第1のプライマーおよび第2のプライマーのそれぞれに対して上流に相補鎖合成の起点を与えることができる2つのアウタープライマーからなる。しかし、いずれかの第1のプライマーおよび第2のプライマーに対してのみ、アウタープライマーを配置する場合でも、本発明の方法を実施することができる。あるいは、第1のプライマーおよび第2のプライマーのそれぞれ、あるいは一方に対して、複数のアウタープライマーを組み合わせることもできる。いずれにせよ、より上流からの相補鎖合成を伴う場合に、第1のプライマーおよび第2のプライマーを複製起点とする相補鎖合成反応の生成物を効率良く生じさせることが可能となる。

【0034】本発明におけるアウタープライマーからの相補鎖合成は、第1のプライマーおよび第2のプライマ

ーを複製起点とする相補鎖合成よりも後に開始されるように設計する。そのための最も単純な方法は第1のプライマーおよび第2のプライマーの濃度をアウタープライマーの濃度よりも高くすることである。具体的には、通常2〜50倍、望ましくは4〜10倍の濃度差でプライマーを用いることにより、第1のプライマーおよび第2のプライマーからの相補鎖合成を優先的に進めさせることができる。またアウタープライマーの融解温度(T_m)を第1のプライマーおよび第2のプライマーの T_m より低くするように設定することによって合成のタイミングをコントロールすることもできる。

【0035】すなわち、 $(R2c/R2) \leq (R1c/R1)$ 、である。なおここで $(R2c/R2) \leq (R1c/R1)$ としたのは、 $R2$ がループ部分にアニールするよりも先に $R1c/R1$ 間のアニールを行わせるためである。 $R1c/R1$ 間のアニールは分子内の反応なので優先的に進む可能性が高い。しかしより望ましい反応条件を与えるために T_m を考慮することには意義がある。同様の条件は、リバースプライマーの設計においても考慮すべきであることは言うまでもない。このような関係とすることにより、確率的に理想的な反応条件を達成することができる。融解温度(T_m)は、他の条件が一定であればアニールする相補鎖の長さや塩基対結合を構成する塩基の組み合わせによって理論的に算出することができる。したがって当業者は、本明細書の開示に基づいて望ましい条件を容易に導くことができる。

【0036】更にアウタープライマーのアニールのタイミングを調整するために、コンティギュアス・スタッキング(contiguous stacking)と呼ばれる現象を応用することもできる。コンティギュアス・スタッキングとは、単独ではアニールすることができないオリゴヌクレオチドが2本鎖部分に隣接することによってアニールが可能となる現象である(Chiara Borghesi-Nicoletti et.al. Bio Techniques 12, 474-477, 1992)。つまり、アウタープライマーを第1のプライマーおよび第2のプライマーに隣接させ、しかもアウタープライマー単独ではインキュベーションの条件下ではアニールできないように設計しておくのである。こうすれば、第1のプライマーおよび第2のプライマーがアニールしたときに初めてアウタープライマーのアニールが可能となるので、必然的に第1のプライマーおよび第2のプライマーのアニールが優先されることになる。この原理に基づいて、一連の反応にプライマーとして必要なオリゴヌクレオチドの塩基配列を設定した例が実施例に記載されている。

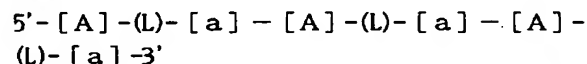
【0037】上記反応において、標的塩基配列を含むポリヌクレオチド試料は、相補鎖合成の鋳型となりうる任意のポリヌクレオチドを利用することができる。具体的には、DNAやRNA、それらの誘導体、並びにキメラ分子を示すことができる。更にポリヌクレオチド試料には、ゲ

ノムDNAやmRNA等の天然のポリヌクレオチドの他、プラスミドやファージなどに人為的に組み込まれたポリヌクレオチドを用いることもできる。ポリヌクレオチド試料は精製したもののみならず、未精製の状態のまま用いることもできる。細胞中のポリヌクレオチドをIn situで合成の対象とすることもできる。

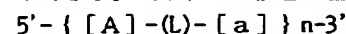
【0038】次に本発明においては、ループの異なる領域に相補鎖合成の起点を与えることができる少なくとも3種類のプライマーが用いられる。プライマーが相補鎖合成の起点を与えるループとは、前記鋳型ポリヌクレオチドが備えているループに加え、その3'末端やいずれかのプライマーを起点とする相補鎖合成の結果生成される新たなポリヌクレオチドによって形成されるループが含まれる。鋳型ポリヌクレオチドは、少なくとも次の2つのループを有する。

1. 標的塩基配列がハイブリダイズすることによって形成されるループ
2. 鋳型ポリヌクレオチドの3'末端が自身にアニールすることによって形成されるループ

【0039】鋳型ポリヌクレオチドが2組以上の相補的な標的塩基配列からなり、かつ相補的な塩基配列が交互に並んでいる場合には、その数に応じたループが鋳型ポリヌクレオチド上に形成される。例えば、ある塩基配列Aと、その相補的な塩基配列aとで構成されるポリヌクレオチドを想定する。複数組の相補的な塩基配列が交互に並んだ状態とは、たとえば次のように表すことができる。



【0040】この例では、隣り合う[A] - [a]間でハイブリダイズが起きたときに3つのループを形成することができる。相補的な塩基配列のハイブリダイズによってループが形成される部分を-(L)-で示した。更に3'末端の自身へのアニールによって形成されるループが加わり、この鋳型ポリヌクレオチドは合計4つのループを形成することになる。なお、3'末端が自身へのアニールによってループを形成するときには、[a]の塩基配列の一部がアニールのために利用される。したがって、3'末端の[a]においては、[A]と相補的な塩基配列でありながら、[A]とはハイブリダイズすることなく自身へのアニールに利用される領域が存在することになる。なお本発明における鋳型ポリヌクレオチドが含むことができる相補的な塩基配列の数は制限されない。したがって、[A]と[a]とで構成される鋳型ポリヌクレオチドを一般式で表すとすれば、次のように表すことができる。式中、nは任意の自然数を意味する。



【0041】一方、鋳型ポリヌクレオチドの3'末端、あるいはいずれかのプライマーを起点とする相補鎖合成の結果生成される新たなポリヌクレオチドによって形成

されるループは、具体的には次のようにして形成される。まず鋳型ポリヌクレオチドは、その3'末端を自身にアニールさせて自身を鋳型とする相補鎖合成反応を行うことができる。この反応は、3'末端とそれがアニールする領域とを繰り返し塩基対結合が可能な状態にすることができれば、連続的に進行する。その結果、鋳型ポリヌクレオチドに相補的な塩基配列が繰り返し伸長することになる。したがって、鋳型ポリヌクレオチドが1組の相補的な塩基配列からなる場合、相補鎖合成によって得られた新たなポリヌクレオチドには、相補鎖合成反応を繰り返す度に相補的な塩基配列の数は倍になる。ここで新たに生成されたポリヌクレオチドにおける2組の相補的な塩基配列がそれぞれハイブリダイズすると、相補的な塩基配列のセットの数に応じた数のループを生じる

【たとえば図3-(9)等】。これらのループのうち、あるものは鋳型ポリヌクレオチドがもともと有していたループである。他方のループは、鋳型ポリヌクレオチドのループの相補的な塩基配列からなっている。このようにして生じた新たなループも、本発明におけるプライマーがアニールするループに含まれる。

【0042】更に本発明におけるループには、鋳型ポリヌクレオチドが有するループにプライマーがアニールして相補鎖合成の起点となることによって生成した新たなポリヌクレオチドに形成されたループが含まれる。たとえば、鋳型ポリヌクレオチドの3'末端が自身にアニールすることによって形成されるループに相補鎖合成の起点を与えることができるプライマーを起点として相補鎖を合成することができる。その生成物は、鋳型に対して相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとなる。このポリヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドと同様に相補的な塩基配列がハイブリダイズすることによって、ループを形成する。すなわち、鋳型ポリヌクレオチドが有するループに相補的な塩基配列からなるループを備えるポリヌクレオチドが生成する。

【0043】本発明におけるプライマーは、このようにして形成される新たなループに相補鎖合成の起点を与えることができるプライマーが含まれる。あるいは、既に述べたように鋳型ポリヌクレオチドが自身の任意の領域に相補的な塩基配列を5'末端に含む場合、これを鋳型として合成されたポリヌクレオチドの3'末端は、自身にアニールしてループを形成することができる。本発明では、このようにして形成されるループに相補鎖合成の起点を与えることができるプライマーを用いることもできる。なお鋳型ポリヌクレオチドの5'末端が自身の任意の領域に対して相補的な塩基配列を含むとき、5'末端は自身にハイブリダイズしてループを形成することができる。5'末端のループも塩基対結合が可能な状態にはある。しかし、このループに相補鎖合成の起点を与えるプライマーからは、通常、ループから5'末端までのわずかな領域についてしか相補鎖合成の対象とすることが

できない。

【0044】本発明のプライマーは、前記のような、いくつかの種類のループから選択される少なくとも1種類、好ましくは2種類、あるいは3種類以上のループにおいて相補鎖合成の起点となることができるプライマーを3種類以上利用する。3種類以上とは、3つのプライマーが相互に異なる位置において相補鎖合成の起点を与えることを意味する。

【0045】本発明におけるプライマーの種類は、少なくとも3種、好ましくは4種、あるいは5種類以上のプライマーを組み合わせることもできる。なお相互に異なる位置とは、プライマーがアニールしたときの各プライマーの3'末端の位置が相互に異なっていることを言う。したがって、アニールに必要な塩基配列を部分的に重複させることもできる。しかしながら、アニールに必要な領域が重複する場合にはプライマーの間で競合を生じるため、できるだけ相互に独立した領域に対してアニールできるようにプライマーの塩基配列を設計することが望ましい。更に、鋳型ポリヌクレオチドにおいてハイブリダイズやアニールの対象となる領域に対しても、できるだけ重複しないようにプライマーの塩基配列を設計することにより、より迅速な相補鎖合成を期待することができる。したがって、たとえば鋳型ポリヌクレオチドと、鋳型ポリヌクレオチドを鋳型として生成する相補鎖合成生成物に形成される、相互に異なるループに対してアニールする3種類以上のプライマーの組み合わせは、本発明に好適なプライマーの組み合わせと言うことができる。

【0046】本発明のプライマーを構成する塩基配列は、前述した複数のループの塩基配列に相補的な塩基配列を含む塩基配列とする。その3'側はループに相補鎖合成の起点を与えられることが求められる。したがって、少なくともその3'末端はループ内に位置するべきである。しかし、アニールに必要な塩基配列の全てがループ内に配置される必要はない。したがって、プライマーが必要な反応条件の下で相補鎖合成の起点を与えることができる限り、たとえばアニールに必要な塩基配列の一部が、ループに隣接する2本鎖ポリヌクレオチドを構成する塩基配列と重複することが許される。また、プライマーの5'側には任意の塩基配列を付加することもできる。本発明において鋳型ポリヌクレオチドが有するループに相補鎖合成の起点を与えるプライマーとして、前述のLAMP用プライマーを用いることができる。

【0047】LAMP法(Nucleic Acid Res. 2000 Vol.28 No.12 e63, WO 00/28082)は、鋳型ポリヌクレオチドに自身の3'末端をアニールさせて相補鎖合成の起点とするとともに、このとき形成されるループに相補鎖合成の起点を与えることができるプライマーを組み合わせることによって高度な等温での相補鎖合成反応を可能とする方法である。LAMP法には、少なくとも次の2つのプライマー

が用いられる。

【1】第1のプライマー；第1のプライマーはその3'末端において標的塩基配列を構成する一方の鎖の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができ、かつ第1のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである。【2】第2のプライマー；第2のプライマーはその3'末端において前記第1のプライマーを起点とする伸長生成物における標的塩基配列の3'側を規定する領域に相補鎖合成の起点を与えることができる塩基配列を備え、かつ第2のプライマーの5'側には、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応生成物の任意の領域に対して相補的な塩基配列を備えるものである。

【0048】つまり、上記鋳型ポリヌクレオチドの合成に用いられた第1のプライマー、および第2のプライマーは、本発明に基づくポリヌクレオチドの合成方法における少なくとも3種のプライマーの一部を構成することができる。言い換えれば、鋳型ポリヌクレオチド、および/または鋳型ポリヌクレオチドに第1または第2のプライマーがアニールして生成する伸長生成物において、前記第1のプライマーおよび第2のプライマーとは異なる位置で相補鎖合成の起点を与えることができるその5'末端を不溶性担体に固定した3つ目のプライマーを組み合わせてることにより、本発明を実施することができる。本発明において、標的塩基配列の合成に必要なプライマーに加えて、組み合わせられる3つ目のプライマーを固定プライマーと呼ぶことがある。

【0049】この固定プライマーの5'末端を固定する不溶性担体としては特に制限はなく、通常の不溶性担体はいずれも使用することが可能である。好適な不溶性担体としては、例えば不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子担体、ポリスチレン、スチレンスチレンスルホン酸共重合体、酢酸ビニルアクリル酸エステル共重合体などの合成高分子担体、その他、金コロイド、磁性粒子などの機能性粒子などが挙げられ、特に合成高分子担体が水などに均一に分散されたラテックスが好ましい。

【0050】なお鋳型ポリヌクレオチドの合成に用いたプライマーを、標的塩基配列を合成するためのプライマーとしても利用することは、必須の条件ではない。鋳型ポリヌクレオチドを合成するためのプライマーとは別に、更に標的塩基配列の合成用のプライマーを加えることも可能である。しかしながら、通常は、より少ない要素で反応を構成するのが合理的である。

【0051】本発明における好ましい固定プライマーとしては、鋳型ポリヌクレオチド、および/または鋳型ポリヌクレオチドに第1または第2のプライマーがアニールして生成する伸長生成物が形成するループにおいて、第1または第2のプライマーとは異なる位置に相補鎖合

成の起点を与えることができるプライマー(固定ループプライマー)が挙げられる。特に望ましい固定ループプライマーとして、R1-R2間(あるいはF1-F2間)の領域に相補鎖合成の起点を与えることができるプライマーを示すことができる。固定ループプライマーは、R1-R2間、あるいはF1-F2間にアニールすることができるプライマーのいずれか1つをLAMP用のプライマーに組み合わせるとき、3種のプライマーが用いられることになる。更にR1-R2間、あるいはF1-F2間にアニールすることができるプライマーを両方とも組み合わせれば、LAMP用プライマーに2種類の固定ループプライマーが加わって、合計で4種類のプライマーを用いることになる。本発明における固定ループプライマーは、少なくとも1種類、望ましくは2種類、あるいはそれ以上の種類を組み合わせることによって、ポリヌクレオチドの合成反応を促進する作用をも期待できる。

【0052】この固定ループプライマーは、R2を含むループ[たとえば図3-(9)等]に対してアニールする。このループは、標的塩基配列におけるR1-R2にかけての領域(ただし図3-(9)においてはR2を含み、R1は含まない)で構成されている。このようなループに対して、本発明の固定ループプライマーは、ループを構成する塩基配列に相補的な塩基配列を含む任意の塩基配列からなるヌクレオチドを固定ループプライマーとすることができる。

【0053】結局、本発明をLAMP法に適用したときに組み合わせられる望ましい固定ループプライマーとして、次の条件を満たすプライマーを挙げることができる。すなわち、鋳型ポリヌクレオチド、および/または鋳型ポリヌクレオチドと第1のプライマーおよび第2のプライマーとの反応によって生成するポリヌクレオチドに形成されるループのうち、第1のプライマーおよび第2のプライマーがアニールできないループにおいて、相補鎖合成の起点を提供することである。固定ループプライマーは、ループ内に相補鎖合成の起点となる3'末端を配置する領域にアニールすることができれば良い。したがって、アニールするための塩基配列が完全にループ内に含まれる場合のみならず、その一部がループ以外の領域に重なる場合であっても、3'末端がループ内に位置する場合には、望ましい条件を満たしていると言うことができる。たとえば、固定ループプライマーがアニールすべき塩基配列の一部が、ループに隣接する2本鎖構造に及んでいる場合であっても、アニールすべき領域を完全にループ内に配置したときと同様の反応促進効果を得られる。

【0054】固定ループプライマーと鋳型ポリヌクレオチドを構成する塩基配列との好ましい位置関係を図5に示した。図5は、自身にアニールするF1の3'末端を起点として相補鎖合成が行われるところを示している。図5は、図2-(5')と同じ構造を示している。すなわ

ちこの図に示された相補鎖合成が完了すれば、本発明における鋳型ポリヌクレオチドが完成するところである。固定ループプライマーRは、R2を含むループにアニールするプライマーであることが、図5に示されている。なお図5は、固定ループプライマーRがアニールする領域を示すために記載したものである。図5の構造に対してアニールした固定ループプライマーRからの相補鎖合成は、実際にはすぐに5'末端に達してしまう。鋳型ポリヌクレオチドから生成する反応生成物に形成される同様の塩基配列からなるループにアニールして相補鎖合成が行われるとき、固定ループプライマーRを起点とする相補鎖合成が反応効率の向上に貢献する。

【0055】本発明をLAMP法に適用するとき、固定プライマーは、LAMP法の条件と同じ条件下でアニールすることが望ましい。全ての反応を温度変化無しで実施できることは、LAMP法の大きな利点である。この利点を損なわないように、本発明のための固定プライマーを組み合わせたときにも、LAMP法のための反応と同じ温度条件で固定プライマーを用いることが理想的である。そのためには、固定プライマーの T_m が、LAMP法のためのプライマーと同じレベルとなるように設計する。 T_m はプライマーを構成する塩基の種類と数、並びに反応液に含まれる塩基の種類や各種の T_m に影響を与える成分によって決定される。したがって、本発明においては、LAMP法のための反応液の条件に合わせて、固定プライマーの T_m をその塩基配列によって調整する。当業者は、各種の条件に合わせてプライマーの塩基配列を調整し適切な T_m を与えることができる。なお、固定ループプライマーに関するこれらの条件は、F1c-F2c（あるいはR1c-R2c）によって構成されるループについても適用されることは言うまでも無い。

【0056】前記のとおり、図2-(5)、あるいは図2-(5')に示された、3'末端を自身にアニールさせて相補鎖合成を行う工程が完了すると、本発明における鋳型ポリヌクレオチドが得られる。更にこの鋳型ポリヌクレオチドのループには、それぞれRA [図2-(6)]、あるいはFA [図2-(6')]がアニールして相補鎖合成が行われ、鋳型ポリヌクレオチドの3'末端は置換によって再び1本鎖となる。1本鎖となった3'末端は、自身にアニールして相補鎖合成が進む結果 [図2-(7)及び図2-(7')]、図2-(8)、および図2-(8')が生成する。このように、ループにプライマーRA、あるいはFAのアニール、相補鎖合成、鋳型ポリヌクレオチドの3'末端の置換、自身へのアニールと相補鎖合成というサイクルが繰り返し行われる。

【0057】このとき、鋳型ポリヌクレオチドの自身を鋳型とする3'末端の伸長によって、やがてループにアニールしたRAやFAを複製起点とする相補鎖合成の生成物が置換され、新たな1本鎖のポリヌクレオチドが生成する [図2-(7)及び図2-(7')]。この1本鎖

ポリヌクレオチドは、3'末端と5'末端に自身に相補的な塩基配列を備える。つまり、ちょうど図2-(5)や図2-(5')と同じ構造の生成物となる。これらは新たな鋳型ポリヌクレオチドとなって、同様の反応が繰り返し進行することとなる。ここまでは、全てLAMP法として明らかにされている反応機序である。

【0058】さて、図2-(8)において、ループにアニールしたプライマーFAは、鋳型ポリヌクレオチドの2本鎖構造を置換しながら伸長して、やがてその5'末端に達する。このとき、置換された鋳型ポリヌクレオチドの3'末端側は1本鎖構造となっている。そのため、自身の相補的な塩基配列が相互にハイブリダイズする。こうして形成されるのが図3-(9)に示す構造である。すなわち鋳型ポリヌクレオチドの3'が自身にアニールし、同時に相補的な塩基配列がハイブリダイズしてループを形成している。相補的な塩基配列がハイブリダイズすることによって形成されるループは、もともとなった鋳型ポリヌクレオチドのループ部分を写し取った相補鎖となっている。このループは、図からも明かなようにR2を含むループで、FAやRAはアニールすることができない。しかし固定ループプライマーRは、R2を含むループにアニールすることができる。そこで、R2を含むループに固定ループプライマーRがアニールして相補鎖合成を開始する。一方で、公知のLAMP法に基づくポリヌクレオチドの増幅反応は継続する。すなわち、鋳型ポリヌクレオチドによる自身を鋳型とする伸長反応と、ループにアニールするプライマーFAとによる増幅反応が継続している。この反応そのものは、新たな鋳型ポリヌクレオチドを連続して生成するポリヌクレオチドの増幅反応に他ならない。なお、既にLAMP法で明らかにされている図3-(9)以降の増幅反応については、ここでは図示しない。

【0059】本発明では、5'末端を不溶性担体に固定した固定プライマーを使用することによって、この固定プライマーを起点とする増幅反応の進行に伴って、以下に示す凝集反応が生じる。図3-(9)のポリヌクレオチドの1本鎖構造のR2を含むループには固定ループプライマーR (Loop R) がアニールし、このLoop Rを起点とする相補鎖伸長反応の進行に伴って、図2-(8)でプライマーFAを起点として得られた伸長生成物が置換され、図3-(10)に示す1本鎖のポリヌクレオチドが生成する。一方、Loop Rの伸長生成物は、図3-(9)のポリヌクレオチドの3'末端F1からの自己を鋳型とする鎖伸長反応によって置換され、図3-(11)に示す1本鎖のポリヌクレオチドが生成する。

【0060】図4にみられるように、この1本鎖ポリヌクレオチド(11)にはF2を含むループ、R2を含むループ、ならびに3'末端のF1がF1cにアニールして形成されるループの計3個のループが存在する。F2

及びR2を含むループには、固定ループプライマーLoopF及びLoopRがアニールし、それぞれ鎖伸長反応が進行する。また、3'末端F1からも自己を鋳型とする鎖伸長反応が進行する。そして、LoopFの伸長生成物は、LoopRを起点とする鎖伸長反応の進行に伴って置換され、1本鎖のポリヌクレオチド(12)が生成する。このポリヌクレオチド(12)の3'末端にはLoopRと相補的な配列LoopRcが存在し、このLoopRcにLoopRがアニールして鎖伸長反応が進行すると、両末端にそれぞれ固定ループプライマーLoopF及びLoopRを有する安定な二本鎖ポリヌクレオチドからなる凝集生成物(13)が生成する。

【0061】一方、LoopRの伸長生成物は、ポリヌクレオチド(11)の3'末端F1からの自己を鋳型とする鎖伸長反応によって置換され、1本鎖のポリヌクレオチド(14)が生成する。このポリヌクレオチド(14)の3'末端にはLoopRと相補的な配列LoopRcが存在し、このLoopRcにLoopRがアニールして鎖伸長反応が進行すると、両末端に固定ループプライマーLoopRを有する安定な2本鎖ポリヌクレオチドからなる凝集生成物(15)が生成する。

【0062】同様の凝集生成物は、図2-(5')に示されたbasic dumbbell form 2を出発物質とし、図2-(5')～図2-(8')の相補鎖合成を経由して進行する対応する反応においても生成する。そして、反応の進行に伴って生成するこれらの凝集生成物は反応系における濁度の変化として分光光度計等の光学的手段を利用するか、もしくは肉眼によって検知することができる。すなわち、本発明によれば、基本LAMP法で使用される第1のプライマーRA、及び第2のプライマーFAに加えて、少なくとも1種類の5'末端を不溶性担体に固定した固定プライマーを使用することによって、新たな検出工程を必要とせず、単に反応系における凝集反応の有無を観察することにより、標的塩基配列が予測された塩基配列であったかどうかを判定することが可能となる。

【0063】本発明における凝集反応は、前記したように2種類の固定ループプライマー(LoopR及びLoopF)を使用する場合のみならず、LoopR又はLoopFいずれか1種類の固定ループプライマーを使用する場合にも速かに進行する。そして、この固定ループプライマーは、ポリヌクレオチドの増幅反応開始時点から反応液中に含まれるものであり、試薬調製が不要であることから、反応中にコンタミネーションが生じるおそれがない。さらに、増幅開始から検出までを一連の反応として等温で行なうことができ、凝集反応後の濁度の測定は分光光度計等の光学的分析機器を使用しなくても、肉眼によっても行なうことができるので、きわめて簡便なポリヌクレオチドの検出方法となる。また、LAMP反応自体には影響を及ぼさず、固定ループプライマーを

使用することによって、基本LAMP法におけるポリヌクレオチドの増幅反応は大幅に促進される。

【0064】ところで本発明の鋳型ポリヌクレオチドは、2本鎖の状態にあるポリヌクレオチドに含まれる標的塩基配列を出発物質として合成することができる。2本鎖の状態にある標的塩基配列にプライマーをアニールさせ、相補鎖合成を行う方法は、本出願人によって出願された特許出願2000-111939に記載されている。図1においては1本鎖の標的塩基配列を出発物質として鋳型ポリヌクレオチドを合成している。しかし2本鎖の状態にあるポリヌクレオチドに含まれる標的塩基配列を出発物質として用いる方法を応用すれば、1本鎖に変性する工程を省略し、2本鎖のポリヌクレオチドをそのまま出発物質として利用することができる。2本鎖ポリヌクレオチドとしては、たとえばcDNAやゲノムDNAを示すことができる。あるいはこれらのDNAを各種のベクターに挿入したものを本発明の2本鎖ポリヌクレオチドとして用いることもできる。一方1本鎖の状態にあるポリヌクレオチドとは、これら2本鎖ポリヌクレオチドを加熱やアルカリ条件等の変性処理によって1本鎖としたものや、あるいはmRNAのようにもともと1本鎖として存在しているポリヌクレオチドを示すことができる。本発明の2本鎖ポリヌクレオチドは、精製されたものであっても良いし、未精製のものであることもできる。また、細胞内に存在する状態(in situ)で、本発明の方法を適用することもできる。細胞内のポリヌクレオチドを鋳型とすることによって、ゲノムのin situ解析が可能となる。

【0065】本発明においてcDNAを鋳型として用いる場合、cDNAを合成する工程と、本発明におけるポリヌクレオチドの合成方法とを、同一の条件下で実施することができる。RNAを鋳型としてcDNAの第1鎖を合成すると、DNA-RNAハイブリッドによる2本鎖ポリヌクレオチドが完成する。この2本鎖ポリヌクレオチドを本発明における鋳型として、ポリヌクレオチドの検出方法を実施することができる。本発明のポリヌクレオチドの検出方法に用いるDNAポリメラーゼが、逆転写酵素活性を備えるものであれば、単一の酵素を用い、同一の条件下でポリヌクレオチドの合成を行うことができる。たとえばBca DNAポリメラーゼは、鎖置換活性を有し、逆転写酵素活性を併せ持つDNAポリメラーゼである。なお、第2鎖を合成したうえで完全な2本鎖cDNAとした後に、本発明によるポリヌクレオチドの検出方法を適用しうることは言うまでも無い。

【0066】2本鎖の状態にあるポリヌクレオチドに含まれる標的塩基配列から鋳型ポリヌクレオチドを合成するときには、まず2本鎖ポリヌクレオチドに任意のプライマーを加え、このプライマーを起点とする相補鎖合成反応が達成できる条件のもとでインキュベートされる。ここで用いられる任意のプライマーとは、第1のプライマーがアニールすべき領域を塩基対結合可能な状態とす

るために用いられる。したがって、任意のプライマーは、標的塩基配列における、第1のプライマーがアニールすべきポリヌクレオチド鎖に対して、その相補鎖にアニールすることができるものである必要がある。更に、本発明における任意のプライマーを複製起点とする相補鎖合成は、第1のプライマーがアニールすべき領域の方向に向かって進行するような位置関係にあるべきである。言い換えれば、第1のプライマーを起点とする相補鎖合成反応において鋳型として機能する領域の、任意の領域に対してアニールするものであることができる。任意のプライマーは、この条件を満たす限り、任意の領域から選択することができる。たとえば、第2のプライマーを、任意のプライマーとして用いることもできる。このような態様は反応に必要な成分を少なくすることから、本発明における望ましい態様の一つである。

【0067】したがってLAMP法に基づいて鋳型ポリヌクレオチドを合成するための反応における工程a)、すなわち標的塩基配列に第1のプライマーをアニールさせ、これを起点とする相補鎖合成反応を行う工程では、任意のプライマーを起点とする相補鎖合成で2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖を置換し、第1のプライマーによる塩基対結合が可能な状態とすることができる。この条件を採用したことによって、温度変化の不要な合成反応が実現できた。任意のプライマーの2本鎖ポリヌクレオチドに対するアニール、およびこのプライマーを起点とする相補鎖合成反応が達成できる条件とは、実際には次の複数の工程を同じ条件下で進めることができる条件といえることができる。

- i) 2本鎖ポリヌクレオチドの状態にある鋳型に対して、プライマーがアニールする
- ii) アニールしたプライマーを複製起点とする相補鎖合成が進む。

【0068】プライマーは、少なくともそれがアニールすべき領域が1本鎖でなければアニールすることはできないと考えられていた。そのため従来は、2本鎖のポリヌクレオチドを鋳型とする場合には、プライマーのアニールに先立って必ず変性によって1本鎖とする工程が実施されてきた。しかし必ずしも完全な1本鎖としなくとも、何らかの手段によって2本鎖が不安定化される条件のもとで、プライマーとインキュベートすることにより、プライマーを起点とする相補鎖合成反応が開始される。2本鎖が不安定化される条件としては、たとえば融解温度（以下、 T_m と省略する）近くにまで加温する方法を示すことができる。あるいは、更に T_m 調整剤を存在させることも有効である。

【0069】本発明において、一連の反応は、酵素反応に好適なpHを与える緩衝剤、酵素の触媒活性の維持やアニールのために必要な塩類、酵素の保護剤、更には必要に応じて融解温度(T_m)の調整剤等の共存下で行う。緩衝剤としては、Tris-HCl等の中性から弱アルカリ性に緩衝

作用を持つものが用いられる。pHは使用するDNAポリメラーゼに応じて調整する。塩類としてはKCl、NaCl、あるいは $(NH_4)_2SO_4$ 等が、酵素の活性維持とポリヌクレオチドの融解温度(T_m)調整のために適宜添加される。酵素の保護剤としては、ウシ血清アルブミンや糖類が利用される。更に融解温度(T_m)の調整剤には、ベタイン、プロリン、ジメチルスルホキシド（以下、DMSOと省略する）、ホルムアミド、およびトリメチルアミンN-オキシドが一般に利用される。融解温度(T_m)の調整剤を利用することによって、前記オリゴヌクレオチドのアニールを限られた温度条件の下で調整することができる。更にベタイン(N,N,N-trimethylglycine)やテトラアルキルアンモニウム塩は、そのisostabilize作用によって鎖置換効率の向上にも有効である。ベタインは、反応液中0.2~3.0 M、好ましくは0.5~1.5 M程度の添加により、本発明におけるポリヌクレオチド増幅反応の促進作用を期待できる。これらの融解温度の調整剤は、融解温度を下げる方向に作用するので、塩濃度や反応温度等のその他の反応条件を考慮して、適切なストリンジェンシーと反応性を与える条件を設定する。 T_m 調整剤を利用することにより、酵素反応に好適な温度条件を容易に設定することができる。 T_m はプライマーと標的塩基配列の関係によって変動する。したがって、酵素活性を維持できる条件と、本発明の条件を満たすインキュベーションの条件とが一致するように、 T_m 調整剤の使用量を調整することが望ましい。本発明の開示に基づいて、プライマーの塩基配列に応じて適切な T_m 調整剤の使用量を設定することは、当業者にとって自明である。たとえば、アニールする塩基配列の長さとそのGC含量、塩濃度、および T_m 調整剤の濃度に基づいて、 T_m を算出することができる。

【0070】このような条件下における2本鎖のポリヌクレオチドに対するプライマーのアニールは、おそらく不安定であると推測される。しかし鎖置換型のポリメラーゼとともにインキュベートすることにより、不安定ながらアニールしたプライマーを複製起点として相補鎖が合成される。相補鎖が合成されれば、プライマーのアニールは次第に安定化されることになる。

【0071】また、本発明の核酸配列を検出する方法では、ピロリン酸塩形成抑制剤の存在下にポリヌクレオチドの増幅反応を行うようにすることができる。LAMP反応において、加速度的に特異的塩基配列を有するDNAが増幅する課程で、ピロリン酸が大量に生成され、反応液中に含まれるマグネシウムと結合して、ピロリン酸マグネシウムの白色沈澱が形成される。この白色沈澱の形成は、目視によっても識別することが可能であり、増幅反応の進行の有無を判断する最も簡易な手段として使用することができるものであるが、本発明のポリヌクレオチドの増幅反応に伴う凝集反応の有無を観察する際には、障害となるものである。このような障害は、LAMP反応液に酵素Pyrophosphatase等のピロリン酸塩形成

抑制剤を反応開始時から一定量添加しておくことによって、抑制することができる。すなわち、ピロリン酸塩形成抑制剤によって、DNA伸長反応により生成するリン酸はモノリン酸のままの状態に保たれ、ピロリン酸マグネシウムの白色沈澱が形成されるのを抑制することができる。ピロリン酸塩形成抑制剤を添加せずに本発明の検出方法を実施する場合には、反応液中の濁度の上昇を分光光度計等の光学的手段を利用して測定する際に、反応液の測定値からピロリン酸マグネシウムの白色沈澱による濁度上昇分をバックグラウンドとして差し引くことによって、固定プライマーによる凝集反応の有無を確認することができる。

【0072】本発明に用いるプライマーは、いずれも化学的に合成することができる。DNAの合成方法は公知である。あるいは天然のポリヌクレオチドを制限酵素などによって切断し、必要な塩基配列で構成されるように改変する、あるいは連結することも可能である。また本発明に用いる各種のプライマーは、天然のDNAと同じ構造のもののみならず、人工的な変異体であることもできる。プライマーとは、標的塩基配列と相補的な塩基対結合を形成できること、そしてその3'末端において相補鎖合成の起点となる-OH基を与えること、の2つの条件を満たすものを意味する。更にプライマーは、望ましくは、相補鎖合成の鋳型となることができる。したがって、そのバックボーンは必ずしもホスホジエステル結合によるものに限定されない。たとえばホスホチオエート体やペプチド結合に基づくペプチド核酸からなるものであることもできる。また、塩基は、相補的な塩基対結合を可能とするものであれば良い。天然の状態では、一般にはACTGおよびUの5種類となるが、たとえばブロモデオキシウリジン(bromodeoxyuridine)といった類似体であることもできる。本発明に用いるオリゴヌクレオチドは、合成の起点となるのみならず、相補鎖合成の鋳型としても機能するものであることが望ましい。

【0073】本発明に用いるプライマーは、本発明を構成する各種のポリヌクレオチド合成反応において、与えられた環境の下で必要な特異性を維持しながら相補鎖との塩基対結合を行うことができる程度の鎖長を持つ。具体的には、5-200塩基、より望ましくは10-50塩基対とする。配列依存的なポリヌクレオチド合成反応を触媒する公知のポリメラーゼが認識するプライマーの鎖長が、最低5塩基前後であることから、アニールする部分の鎖長はそれ以上である必要がある。加えて、塩基配列としての特異性を期待するためには、確率的に10塩基以上の長さを利用するのが望ましい。一方、あまりにも長い塩基配列は化学合成によって調製することが困難となることから、前記のような鎖長が望ましい範囲として例示される。なお、ここで例示した鎖長はあくまでも相補鎖とアニールする部分の鎖長である。たとえばRAは、少なくとも2つの領域R2およびR1cからなっている。した

がって、ここに例示する鎖長は、プライマーを構成する各領域の鎖長と理解するべきである。本発明において用いられる鋳型という用語は、相補鎖合成の鋳型となる側のポリヌクレオチドを意味する。鋳型に相補的な塩基配列を持つ相補鎖は、鋳型に対応する鎖としての意味を持つが、両者の関係はあくまでも相対的なものに過ぎない。すなわち、相補鎖として合成された鎖は、再び鋳型として機能することができる。つまり、相補鎖は鋳型になることができる。

【0074】本発明におけるポリヌクレオチドの合成方法、あるいは増幅方法には、鎖置換を伴う相補鎖合成反応を触媒することができるDNAポリメラーゼが利用される。この種のポリメラーゼは、SDAなどに用いられたDNAポリメラーゼと同様のものが用いられる。すなわち、ある塩基配列の3'側に相補的なプライマーを合成起点として相補鎖合成を行うときに、5'側に2本鎖の領域が有るとその2本鎖を置換しながら相補鎖の合成を行う特殊なポリメラーゼが公知である。本発明においては、更に相補鎖合成に必要な基質が添加される。

【0075】本発明におけるポリヌクレオチドの合成方法を支えているのは、鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒することができるDNAポリメラーゼである。この種のDNAポリメラーゼには、以下のようなものが知られている。また、これらの酵素の各種変異体についても、それが配列依存型の相補鎖合成活性と鎖置換活性を有する限り、本発明に利用することができる。ここで言う変異体とは、酵素の必要とする触媒活性をもたず構造のみを取り出したもの、あるいはアミノ酸の変異等によって触媒活性、安定性、あるいは耐熱性を改変したもの等を示すことができる。

Bst DNAポリメラーゼ

Bca(exo-)DNAポリメラーゼ

DNAポリメラーゼIのクレノウ・フラグメント

Vent DNAポリメラーゼ

Vent(Exo-)DNAポリメラーゼ (Vent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)

DeepVent DNAポリメラーゼ

DeepVent(Exo-)DNAポリメラーゼ (DeepVent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの)

Φ29ファージDNAポリメラーゼ

MS-2ファージDNAポリメラーゼ

Z-Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造)

KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績)

【0076】これらの酵素の中でもBst DNAポリメラーゼやBca(exo-)DNAポリメラーゼは、ある程度の耐熱性を持ち、触媒活性も高いことから特に望ましい酵素である。本発明において、特に2本鎖の状態にあるポリヌクレオチドを鋳型として用いる場合には、プライマーのアニールと相補鎖合成反応とを同一条件下で行う。このような反応は、しばしばある程度の加温を必要とすること

から、酵素が耐熱性であることは望ましい条件の一つである。耐熱性の酵素を用いることにより、幅広い反応条件に対応することができる。

【0077】たとえばVent(Exo-)DNAポリメラーゼは、鎖置換活性と共に高度な耐熱性を備えた酵素である。ところでDNAポリメラーゼによる鎖置換を伴う相補鎖合成反応は、1本鎖結合タンパク質(single strand binding protein)の添加によって促進されることが知られている(Paul M.Lizardi et al, Nature Genetics 19, 225-232, July, 1998)。この作用を本発明に応用し、1本鎖結合タンパク質を添加することによって相補鎖合成の促進効果を期待することができる。Vent(Exo-)DNAポリメラーゼに対しては、1本鎖結合タンパク質としてT4 gene 32が有効である。なお3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を持たないDNAポリメラーゼには、相補鎖合成が鋳型の5'末端に達した部分で停止せず、1塩基突出させた状態まで合成を進める現象が知られている。本発明では、相補鎖合成が末端に至ったときの3'末端の配列が次の相補鎖合成の開始につながるため、このような現象は望ましくない。しかし、DNAポリメラーゼによる3'末端への塩基の付加は、高い確率でAとなる。したがって、dATPが誤って1塩基付加しても問題とならないように、3'末端からの合成がAで開始するように配列を選択すれば良い。また、相補鎖合成時に3'末端がたとえ突出してしまっても、これを消化してblunt endとする3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を利用することもできる。たとえば、天然型のVent DNAポリメラーゼはこの活性を持つことから、Vent(Exo-)DNAポリメラーゼと混合して利用することにより、この問題を回避することができる。

【0078】これらのDNAポリメラーゼに対して、PCRなどで一般に用いられているTaqポリメラーゼ等のDNAポリメラーゼは、通常の条件では鎖置換作用は実質的に見られない。しかし、この種のDNAポリメラーゼであっても、鎖置換が可能な条件を与えることができる場合には、本発明に利用することができる。

【0079】LAMP法は、標的塩基配列のプライマーがアニールすべき領域が適切な位置関係にあり、しかもその塩基配列が設計どおりであった場合に、高度な増幅反応が起きる。言い換えれば、相補鎖合成の起点としなければならない領域において、標的塩基配列が予測した塩基配列と異なっていたときには、LAMP法が著しく阻害される。特に、自身にアニールする3'末端を起点とする相補鎖合成は重要である。LAMP法においては、自身にアニールする3'末端は、プライマーの5'末端に配置された塩基配列を鋳型として合成される相補鎖の3'末端に相当する。したがって、第1のプライマー(RA)および/または第2のプライマー(FA)の5'側に配置された領域(R1あるいはF1)の5'末端、あるいはその近辺に、検出すべき変異部位に相補的な塩基を配置するようにするのが望ましい。そこで、この重要な配列を検出すべき

変異に対応するように設計すれば、LAMP法による増幅反応の進行に伴って生じる凝集生成物を観察することによって、塩基の欠失や挿入といった変異の有無、あるいはSNPsのような遺伝子多型を分析することができる。

【0080】より具体的には、変異や多型が予想される塩基が、相補鎖合成の起点となる3'末端付近(相補鎖が起点となる場合には5'末端付近)に相当するように設計するのである。すなわち、プライマーや、自身に相補的な3'末端がアニールする領域において、いずれかの塩基が予測された塩基とは異なっているときに、そのプライマーを起点とする相補鎖合成が妨げられるように設計するのである。ここで、予測される塩基配列とは、野生型であっても、変異型であっても良い。変異型を予測した場合には、特定の変異があったときのみ、相補鎖合成が開始することになる。相補鎖の合成起点となる3'末端や、その付近にミスマッチが存在するとポリヌクレオチドの相補鎖合成反応は著しく阻害される。したがって増幅反応に伴う凝集生成物が観察されたときには、標的塩基配列は予測した塩基配列からなっていると判定することができる。逆に、もしも増幅に伴う凝集生成物が対照と同程度に生じないときには、標的塩基配列は予測した塩基配列とは異なっていると判定できる。LAMP法においては、反応初期の生成物における末端構造が繰り返し反応を行わなければ高度な増幅反応に結びつかない。したがって、たとえ誤った合成が行われたとしても、増幅反応を構成する相補鎖合成がいずれかの段階で常に妨げられるのでミスマッチを含んだままでは高度な増幅は起きない。結果的にミスマッチが増幅反応を効果的に抑制し、最終的には正確な結果をもたらすことになる。つまりLAMP法に基づくポリヌクレオチドの増幅反応は、より完成度の高い塩基配列のチェック機構を備えているとすることができる。これらの特徴は、たとえば単純に2つの領域で増幅反応を行っているPCR法などでは期待しにくい利点である。

【0081】本発明によるポリヌクレオチドの検出方法に必要な各種の試薬類は、あらかじめパッケージングしてキットとして供給することができる。すなわち、本発明はポリヌクレオチドの増幅反応に伴う凝集反応の有無を利用した標的塩基配列の検出用キットを提供する。具体的には、本発明のために、第1のプライマーおよび第2のプライマー、不溶性担体に5'末端を固定した固定プライマーとして必要な各種のオリゴヌクレオチド、相補鎖合成の基質となるdNTP、鎖置換型の相補鎖合成を行うDNAポリメラーゼ、酵素反応に好適な条件を与える緩衝液といった試薬類で構成されるキットが提供される。本発明のキットには、アウトプライマーを組み合わせることができる。アウトプライマーを組み合わせることにより、等温での反応が可能となる。また、本発明による標的塩基配列の検出用キットには、アウトプライマーに加えて、融解温度調整剤やピロリン酸塩形成

抑制剤、更に必要に応じて合成反応生成物の検出のために必要な試薬類を組み合わせることができる。特に、本発明の望ましい態様においては、反応途中で試薬の添加が不要なことから、1回の反応に必要な試薬を反応容器に分注した状態で供給することにより、サンプルの添加のみで反応を開始できる状態とすることができる。また、増幅反応に伴う凝集生成物の検出を反応容器のままで行なうことが可能となり、反応後の容器の開封を全

(λ DNA : 配列番号 1)

GCTTATCITT CCCTTTATTT TTGCTGCGGT AAGTCGCATA AAAACCATTC TTCATAATTC
AATCCATTTA CTATGTTATG TTCTGAGGGG AGTGAAAATT CCCCTAATTC GATGAAGATT
CTTGCTCAAT TGTATCAGC TATGCGCGA CCAGAACACC TTGCCGATCA GC (172base)

【 0083 】 インナープライマーFA (Inner F : 配列番号 2) : CGTGAGCAAT GGTATATGC AATAGAGCT CTGTGTTTGTCTTCCTGC (48base)、

インナープライマーRA (Inner R : 配列番号 3) : ATGTCCTTGT CGATATAGGG ATGAAGCACA TTATCCTGAA TTTTCGGTG (49base)、

アウタープライマーF3 (Outer F : 配列番号 4) : CCTGCCTCCA AAGGATACCT (20base)、及び

アウタープライマーR3 (Outer R : 配列番号 5) : TTGTGTGAT ATAGGACAGA CA (22base)

【 0084 】 次に、上記プライマーによって規定されるR1とF1に同方向となるように、以下のループプライマーを設計した。ループプライマーを設計する場所は、

(M13 DNA : 配列番号 8)

GOGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCGC GCTTTGGCG ATTCAATTAAT GCAGCTGGCA
CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG TGAGTTAGCT
CACTCATTAG GCACCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCOG GCTCGTATGT TGTGTGGAAT
TGTGAGCGGA TAACAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTGAGCT
CGGTACCCGG GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGAATGC AAGCTTGGCA CTGGCCGTG
TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAACCCCTG GCGTTACCCA ACTTAATGCG CTGTCAGCAC
ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG CACCGATGCG CCTTCCCAAC
AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCT TTGCCTGTT TCGGCGACCA GAAGCGGTGC
CGGAAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTTCCTG AGGCCGATAC GGTGTCGTC CCTCAAAC
GGCAGATGCA CGGTTACGAT GCGCCCATCT ACACCAACGT AACCTATCCC ATTAGCGTCA
(600base)

【 0086 】 インナープライマーFA (Inner F : 配列番号 9) : CGACTCTAGA GGATCCCCGG TACTTTTGT TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG AT (52base)

インナープライマーRA (Inner R : 配列番号 10) : ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTTTTGT TCGGGCCTC TCGCTATTA C (51base)

アウタープライマーF3 (Outer F : 配列番号 11) : ACTTTATGCT TCGGCTCGT A (21base)

アウタープライマーR3 (Outer R : 配列番号 12) : GTTGGGAAGG GCGATCG (17base)

【 0087 】 次に、上記プライマーによって規定されるR1とF1に同方向となるように、以下のループプライマーを設定した。また、ループプライマーは公知の方法にて

面的に廃止することができる。これは、コンタミネーションの防止上、たいへん望ましいことである。以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

【 0082 】

【 実施例 】 1. 固定ループプライマーの設計

以下に示す塩基配列 (配列番号 1) を有する λ DNA を標的塩基配列として、公知のLAMP法 (WO 00/28082) に基づいて、以下のプライマーをそれぞれ設計した。

LAMP反応中に生成するループ構造のR2あるいはF2領域以外とし、方向はR1あるいはF1と同じ向きとした。なおR1やF1とは、鋳型ポリヌクレオチドが自身にアニールして相補鎖合成を行う方向と同じ方向を意味する。ループプライマーは、公知の方法により5'末端をアミノ基で修飾したものを使用した。

ループプライマーF (Loop F : 配列番号 6) : (NH₂) GGA ACTCGG GTGCTATCAG (20base)、および

ループプライマーR (Loop R : 配列番号 7) : (NH₂) TGA CCTTCT CTCCCATATT GCAGTCG (27base)

【 0085 】 つぎに、以下に示す塩基配列 (配列番号 8) を有するM13 DNAを標的塩基配列として、同様に以下のプライマーをそれぞれ設計した。

5'末端をアミノ基修飾したものをを用いた。

ループプライマーF (Loop F : 配列番号 13) : (NH₂) CATGGTCATA GCTGTTTCCT GTGT (24base)

ループプライマーR (Loop R : 配列番号 14) : (NH₂) CA ACTTAATC GCCTTGACG AC (22base)

【 0088 】 2. 固定ループプライマーの調製

上記の各ループプライマーについて、次の手順でその5'末端をラテックス粒子に固定して、固定ループプライマーを調製した。10mM MES (Morpholinol Ethane sulfonic acid) (pH6) 緩衝液 (和光純薬工業社製) 中で、平均粒径103nmのカルボキシル基含有ポリスチレンラテックス (固形分1% (w/w)、JSR社製) 100 μl および2000 pmol の5'末端アミノ修飾ループプライマーを混合し (最終

容量1ml)、水溶性カルボジイミドEDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride)水溶液 10mg/mlを必要量添加する。EDC水溶液の必要量とは、使用するカルボキシラテックス表面上のカルボキシル基の総量の約5倍等量が好ましい。EDC添加後、65℃温浴中で4時間反応させた後、更に2M Glycine(和光純薬社製)を含有する上記MES緩衝液 1mlを添加し、さらに65℃温浴中で1時間反応させた。この反応によって、ラテックス粒子上のカルボキシル基とループプライマーの5'末端アミノ基の間で安定なエステル結合を形成し、さらにGlycineによって余剰のEDCとラテックス粒子上の活性化カルボキシル基をブロックする。

【0089】上記の化学結合反応終了後、洗浄液の添加と超遠心分離(80,000rpm/10分)後の上清除去、そして超音波処理による再分散を繰り返すことによって、ラテックス粒子の洗浄を行った。洗浄液は以下のものを用いた。

洗浄液1:0.1% SDSを含むTE緩衝液(10mM Tris/HCl pH7.5, 1mM EDTA)

洗浄液2:0.25M NaClおよび0.1% SDSを含むTE緩衝液(10mM Tris/HCl pH7.5, 1mMEDTA)

洗浄液3:滅菌水

各洗浄液で少なくとも二回ずつ洗浄を行った。洗浄後、最終的に固形分0.25%になるように滅菌水で再分散させ、固定ループプライマーを含むラテックス液を得、4℃で保存した。

【0090】3. 固定ループプライマーによる凝集反応
上記2. で得られた5'末端をラテックス粒子に固定した固定ループプライマーを、LAMP法の増幅反応開始時当初から反応液に添加し、増幅反応後に生じる凝集反応について検討した。

【0091】(実施例1)

(λ DNA LAMP反応液の組成: 25 μ l中)

- ・ 20mM Tris-HCl pH8.8
- ・ 10mM KCl
- ・ 10mM (NH₄)₂SO₄
- ・ 4mM MgSO₄
- ・ 1M Betaine
- ・ 0.1% Triton X100
- ・ 0.4mM dNTPs
- ・ 8U Bst polymerase (NEB)
- ・ 1600nM λ DNA Inner F(配列番号2)
- ・ 1600nM λ DNA Inner R(配列番号3)
- ・ 400nM λ DNA Outer F(配列番号4)
- ・ 400nM λ DNA Outer R(配列番号5)

上記の λ DNA LAMP反応液に、次のa.) ~c.) を添加し、反応後に生じる凝集反応について、観察した。

- a.) ループプライマー溶液 [λ DNA Loop F (配列番号6) および λ DNA Loop R (配列番号7)]
- b.) ループプライマー溶液 (λ DNA Loop Fおよび λ DNA

Loop R)、および未感作ラテックス液(0.25%固形分)
c.) 固定ループプライマーを含むラテックス液(λ DNA Loop Fおよび λ DNA Loop Rをそれぞれ上記2. によりラテックス粒子に固定したものの等量混合物: 0.25%固形分)

【0092】上記の λ DNA LAMP反応液に、a.) ~c.) をそれぞれ4 μ l添加する。したがって、b.) および c.) の反応液中には10 μ gのラテックス(0.04%固形分)が含まれる。Positive/Negativeの比較のため、Positive試料として λ DNA 1x10⁶分子、Negative試料としてDNAを含まない滅菌水を被験体として用いた。90分間・65℃で反応を行い、反応終了後の濁度をPharmacia社製分光光度計Ultrospect2000を用い、可視光570nmの波長での濁度を測定した(反応液量が少ないために、滅菌水でそれぞれ4倍に希釈して測定に供した)。結果を、図6及び図7に示す。

【0093】Negative試料では、増幅反応が進行しないので、濁度の上昇は確認されないが(ラテックスが含まれる反応液はラテックス分の濁度のみ)、特異的な配列を含むPositive試料では、すべての例において濁度の上昇が観察される(図6)。ラテックスを含まない a.) の濁度の上昇は増幅反応中に生成されるピロリン酸マグネシウムによる白色沈殿によるもので、この白沈による濁度上昇は b.) および c.) においても同様に起こる。しかし、そのa.) の白色沈殿による濁度上昇分を差し引くと、b.) ではPositive試料とNegative試料で、有意の濁度の変化は確認されないが(OD570nm / 0.089及び0.065)、c.) においては有意な濁度の上昇が確認された(OD570nm / 0.064及び0.329)(図7)。以上の結果から、固定ループプライマーを、特異的なLAMP反応液に最初から添加した場合にのみ、増幅反応の進行に伴って凝集反応が生じることわかる。増幅反応の進行によってピロリン酸マグネシウムによる白色沈殿が生じるが、それによる濁度上昇分を差し引けば、特異的な増幅が進んだかどうかをラテックス同士の凝集による濁度上昇で判断することが可能である(上記白色沈殿への対応については実施例4で記述する)。

【0094】(実施例2: 凝集反応の特異性の確認その1) この例では、本発明の固定ループプライマーの塩基配列による特異性を確認するために、対照として特定の増幅産物のSingle Strand Loop部分とはアニールしない、異種の固定ループプライマーを使用して、実施例1と同様にして凝集反応を観察した。実施例1の λ DNA LAMP反応液に、次のa.) ~c.) をそれぞれ4 μ l添加し、反応後に生じる凝集反応について、観察した。したがって、b.) および c.) の反応液中には10 μ gのラテックス(0.04%固形分)が含まれる。

- a.) ループプライマー溶液 [λ DNA Loop F (配列番号6) および λ DNA Loop R (配列番号7)]
- b.) 固定ループプライマーを含むラテックス液 (λ DNA

Loop Fおよび入DNA LoopRをそれぞれ上記2. によりラテックス粒子に固定したものの等量混合物: 0.25%固形分)

c.) 固定ループプライマーを含むラテックス液 [M13 DNA Loop F(配列番号13)およびM13 DNA Loop R(配列番号14)]をそれぞれ上記2. によりラテックス粒子に固定したものの等量混合物: 0.25%固形分]

【0095】Positive/Negativeの比較のため、Positive試料として入DNA 1×10^5 分子、Negative試料としてDNAを含まない滅菌水を被験体として用いた。90分間・65℃で反応を行い、反応終了後の濁度をPharmacia社製分光光度計Ultrospect2000を用い、可視光570nmの波長での濁度を測定した(反応液量が少ないために、滅菌水でそれぞれ4倍に希釈して測定に供した)。結果を、図8及び図9に示す。図8及び図9によれば、実施例1と同様に、濁度の上昇が確認されないNegative試料に対し、Positive試料では、ピロリン酸マグネシウムの白色沈殿分の濁度上昇分も併せてすべてにおいて濁度が上昇する。

(図8)。しかし、この白色沈殿による濁度上昇分を差し引いた、ラテックスだけによる濁度上昇は、生成される増幅産物が有する塩基配列に特異的な固定ループプライマーを含むラテックス液を加えたb.)の系でしか起こらない。図9にみられるように、b.)では0.087から0.285に上昇したのに対して、c.)では0.141から0.129と有意の変化は見られない。

【0096】すなわち、たとえ別の増幅産物が加速度的に増幅されようとも、目的の増幅産物が生成されない限り、特異的な塩基配列を有する固定ループプライマーによる凝集反応は生じないことがわかる。データには示さないが、この逆、つまりM13 DNA LAMP反応系にM13 DNA用または入DNA用の固定ループプライマーを添加して、増幅反応の進行にともなう凝集の有無を確認したところ、M13 DNA 用固定ループプライマーを添加した場合にのみ凝集反応が認められた。以上の結果から、当該凝集反応は目的とする増幅反応のみを極めて特異的に認識し、進行する。その反応特異性はループプライマーの塩基配列に厳密に規定されるもので、使用するその塩基配列によって特異性は大きく影響される。

【0097】(実施例3: 凝集反応の特異性の確認その2) ラテックス凝集反応と同時に、LAMP反応の増幅特異性を再確認するために、入DNA LAMP反応液に、入DNA 用固定ループプライマーを添加した反応系に、次のa.)〜c.)を添加して反応を行った。

- a.) 滅菌水 (DNA フリー)
- b.) 入DNA (1×10^5 分子)
- c.) M13 DNA (6×10^5 分子)

各反応においては、実施例1の入DNA LAMP反応液に、実施例1のc.)入DNA 用固定ループプライマーを含むラテックス液を4 μ l添加した。したがって、すべての反応液中には10 μ gのラテックス(0.04%固形分)が含まれ

る。

【0098】すなわち、この例では比較のために、Negative試料としてa.)にDNAを含まない滅菌水を、c.)にM13 DNAを 6×10^5 分子、そしてPositive試料として入DNA 1×10^5 分子を、それぞれ被験体として使用した。90分間・65℃で反応を行い、反応終了後の濁度をPharmacia社製分光光度計Ultrospect2000を用い、可視光570nmの波長での濁度を測定した(反応液量が少ないために、滅菌水でそれぞれ4倍に希釈して測定に供した)。結果を図10に示す。また、増幅終了後の反応液を2%アガロースゲルにて電気泳動し、SYBR-Greenで染色し、増幅の確認を行った。結果を図11に示す。

【0099】LAMP反応の特異性により、目的の塩基配列が含まれる入DNA のみで増幅が確認された(図11)。同時に、ラテックス凝集による濁度の上昇もb.)の入DNA のみで認められ、凝集反応の特異性をも確認することができた(図10)。データには示さないが、この逆、つまりM13 DNA LAMP/M13 DNA用固定ループプライマーの反応系においても同様に反応特異性が認められた。以上の結果から、当該凝集反応は目的とする増幅反応のみを極めて特異的に認識し、進行する。特に標的塩基配列を含まないDNA検体が含まれた場合でも、固定ループプライマーのみでは増幅反応も凝集反応も進行しない。その反応特異性は、ループプライマーの塩基配列に厳密に規定されるもので、使用するその塩基配列によって特異性は大きく影響される。

【0100】(実施例4: ピロリン酸マグネシウム白色沈殿への対応)この例では、ピロリン酸塩形成抑制剤として酵素Pyrophosphataseを使用し、LAMP法による増幅及び凝集反応を行った。入DNA LAMP反応液として、実施例1の入DNA LAMP反応液に、5mlのPyrophosphataseを添加したものを使用し、この入DNA LAMP反応液に、実施例1のa.)〜c.)をそれぞれ4 μ l添加する。したがって、b.)およびc.)の反応液中には10 μ gのラテックス(0.04%固形分)が含まれる。被検体DNAとして、Positive試料である入DNA (1×10^5 分子)をすべてに添加し、90分間・65℃で反応を行い、反応終了後の濁度をPharmacia社製分光光度計Ultrospect2000を用い、可視光570nmの波長での濁度を測定した(反応液量が少ないために、滅菌水でそれぞれ4倍に希釈して測定に供した)。結果を図12に示す。また、増幅終了後の反応液を2%アガロースゲルにて電気泳動し、SYBR-Greenで染色し、増幅の確認を行った。結果を図13に示す。全ての例において特異的な増幅反応は行われたが(図13)、これまで懸案であったピロリン酸マグネシウムの白色沈殿はa.)においても確認されず、濁度の上昇はなかった。ラテックスを含むb.)とc.)を比較して、固定ループプライマーを含むc.)において、有意に濁度が上昇していることから、Pyrophosphataseの使用によって、増幅反応の進行に伴う特異的な凝集反応には影響が無いことが確認された(図1

2)。

【0101】(実施例5)実施例4で使用した、ピロリン酸塩形成抑制剤として酵素Pyrophosphataseを含有するλDNA LAMP反応液に、次のa.)~d.)をそれぞれ4μl添加した。したがって、すべての反応液中には10ugのラテックス(0.04%固形分)が含まれる。

a.) λDNA 用固定Loop F を含むラテックス液 (λDNA Loop Fを上記2. によりラテックス粒子に固定したものの: 0.25%固形分)

b.) λDNA 用固定Loop R を含むラテックス液 (λDNA Loop Rを上記2. によりラテックス粒子に固定したものの: 0.25%固形分)

c.) 上記 a.)および b.) の等量混合物

d.) λDNA 用Loop F およびλDNA 用Loop R を混合して固定した固定ループプライマー (2種類のループプライマーを、同時に上記2. によりラテックス粒子に固定したものの: 0.25%固形分)

【0102】Positive/Negativeの比較のため、Positive試料としてλDNA 1x10⁵分子、Negative試料としてDNAを含まない滅菌水を被験体として用いた。90分間・65℃で反応を行い、反応終了後の濁度をPharmacia社製分光光度計Ultrospect2000を用い、可視光570nmの波長での濁度を測定した(反応液量が少ないために、滅菌水でそれぞれ4倍に希釈して測定に供した)。結果を図14に示す。固定ループFまたは固定ループRをそれぞれ単独で使用した場合にも、濁度に若干の差は認められるものの、凝集反応は進行する。同様に、固定ループFおよび固定ループRの等量混合物を使用した場合においても、凝集反応は問題なく進行するが、濁度の上昇は最も大きかった。

【0103】これに対して、同一ラテックス上にループFおよびループRを同時に固定した固定ループプライマーを使用した場合には、濁度の上昇は極めて小さい(図14)。この場合には、ラテックス上に固定したループプライマーから伸長した塩基配列に相補的なループプライマーが同一ラテックス上に存在するので、同じラテックス上でハイブリダイズを完了してしまう機会が多くなり、複数のラテックス粒子が結合することによる凝集反応が生じにくくなるためと考えられる。すなわち、ラテックス上に固定したループプライマーから伸長した塩基配列に、別の固定ループプライマーがハイブリダイズする過程において、別のラテックス粒子とハイブリダイズしてマトリクスを形成し凝集塊を形成しやすい、他のa.) b.) およびc.) と比較して、d.)では同じラテックス上でハイブリダイズを完了してしまう機会が多く、凝

集に不適当な条件であると推測される。

【0104】これを確認するために、上記と同様のLAMP増幅・凝集反応において、反応液中にエチジウムブロマイドをインターカレーターとして添加し、増幅速度をABI社7700を用いてそれぞれ確認を行った。結果を図15に示す。上記の結果に呼応するように、増幅効率はc.) > b.) > a.)の順で速く、d.)は最も遅かった。おそらくd.)は伸長鎖とそれと相補なループプライマーとのハイブリダイズが同一ラテックス上で起きてしまい、ループプライマー本来の増幅効率を高める効果も反応の過程で失ってしまうものと推測される。

【0105】

【発明の効果】本発明によれば、特定の構造を持った鎖型ポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドの特定の位置で相補鎖合成の起点を与えることができる不溶性担体に固定したプライマーを組み合わせることににより、次のような顕著な効果を奏する。

(1) LAMP反応による増幅産物は自己相補配列の繰返しを持つので、1種類の固定化プライマーのみで増幅産物は凝集反応を起こす。

(2) 相補鎖合成の反応効率を改善するとともにポリヌクレオチドの増幅反応の進行に伴って生じる凝集反応を観察することによって、きわめて簡単かつ迅速に試料中の標的核酸配列を検出することができる。

(3) 反応系にピロリン酸塩形成抑制剤を添加した場合には、LAMP法の増幅反応に伴うピロリン酸マグネシウムの形成を防止することができるので、きわめて簡単に凝集反応の有無を確認することが可能になる。

(4) 反応の途中で試薬を添加する必要がなく、増幅反応に伴う凝集生成物の検出を反応容器のままで行なうことが可能となり、反応後の容器の開封を全面的に廃止することができるので、容易にコンタミネーションを防止することができる。

(5) LAMP反応は等温で連続的に進行するので、凝集反応による吸光度の変化を経時的に測定することにより、核酸の増幅の有無をリアルタイムにモニタリングすることが可能である。

本発明は、等温での反応が可能で、増幅反応時のミスマッチを抑制し、効率良く標的核酸配列を検出することができるというLAMP法の特徴を全て実現しつつ、きわめて簡単に標的核酸配列を検出する方法と、その方法に使用する検出用キットを提供するものであり、実用的価値の高い発明である。

【0106】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eiken Chemical Co., Ltd.

<120> A Method for Detecting Polynucleotide and a kit therefor

<;130>;

<;140>;

<;141>;

<;160>; 14

<;170>; PatentIn Ver. 2.1

<;210>; 1

<;211>; 172

<;212>; DNA

<;213>; Bacteriophage lambda

<;400>; 1

gettatcttt ccctttatctt ttgctgcggt aagtcgcata aaaaccattc ttcataattc 60
aatccattta ctatgttatg ttctgagggg agtgaaaatt cccctaattc gatgaagatt 120
cttgctcaat tgttatcagc tatgcgccga ccagaacacc ttgccgatca gc 172

<;210>; 2

<;211>; 48

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 2

cgtgagcaat ggttatatgc aaatagagct ctgtgtttgt cttcctgc 48

<;210>; 3

<;211>; 49

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 3

atgtccttgt cgatataggg atgaagcaca ttatcctgaa ttttcggtg 49

<;210>; 4

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 4

cctgcctcca aacgatacct

20

<;210>; 5

<;211>; 22

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 5

ttgtggtgat ataggacaga ca

22

<;210>; 6

<;211>; 20

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 6

ggaactccgg gtgctatcag

20

<;210>; 7

<;211>; 27

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 7

tgacctttct ctcccatatt gcagtcg

27

<;210>; 8

<;211>: 600

<;212>: DNA

<;213>:

<;400>: 8

gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gctttggccg attcattaat gcagctggca 60
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cggtacccgg ggatcctcta gactcgacct gcaggaatgc aagcttggca ctggccgtcg 300
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac 360
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac 420
agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgct ttgcctgggt tccggcacca gaagcgggtc 480
cggaagctg gctggagtgc gatcttctg aggccgatac ggtcgtcgtc ccctcaaact 540
ggcagatgca cggttacgat gcgcccatct acaccaacgt aacctatccc attacggtca 600

<;210>: 9

<;211>: 52

<;212>: DNA

<;213>: Artificial Sequence

<;220>:

<;223>: Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>: 9

cgactctaga ggatccccgg gtactttttg ttgtgtggaa ttgtgagcgg at 52

<;210>: 10

<;211>: 51

<;212>: DNA

<;213>: Artificial Sequence

<;220>:

<;223>: Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>: 10

acaacgtcgt gactgggaaa accctttttg tgcgggcctc ttcgtatta c 51

<;210>: 11

<;211>: 21

<;212>: DNA

<;213>: Artificial Sequence

<;220>:

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 11

actttatgct tccgctcgt a

21

<;210>; 12

<;211>; 17

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 12

gttgggaagg gcgatcg

17

<;210>; 13

<;211>; 24

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 13

catggtcata gctgttcct gtgt

24

<;210>; 14

<;211>; 22

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<;400>; 14

caacttaatc gccttcgagc ac

22

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明を利用したポリヌクレオチドの増幅方法
の反応原理を示す図。

図中、FA : LAMP法用プライマーFA

RA : LAMP法用プライマーRA

【図2】本発明を利用したポリヌクレオチドの増幅方法
の反応原理を示す図。図中の略号は図1と同じ意味を表
す。

【図3】本発明を利用したポリヌクレオチドの増幅方法
の反応原理を示す図。

loop F : 固定ループプライマーF

loop R: 固定ループプライマー-R

【図4】本発明を利用したポリヌクレオチドの増幅方法の反応原理を示す図。図中の略号は図3と同じ意味を表す。

【図5】ループプライマーと鎖型ポリヌクレオチドを構成する塩基配列との好ましい位置関係を示す図。

【図6】実施例1でλ DNA LAMP反応を行った反応液の可視光570nmの波長での濁度を測定した結果を示す図。

- a.) 未固定ループプライマーを使用した場合。
- b.) 未固定ループプライマー及び未感作ラテックス液を使用した場合。
- c.) 固定ループプライマーを含むラテックス液を使用した場合。

【図7】実施例1でλ DNA LAMP反応を行った反応液の可視光570nmの波長での濁度を測定した結果を示す図。増幅反応の進行に伴って形成されるピロリン酸マグネシウムによる濁度上昇分を差し引いたもの。

【図8】実施例2でλ DNA LAMP反応を行った反応液の可視光570nmの波長での濁度を測定した結果を示す図。

- a.) 未固定ループプライマーを使用した場合。
- b.) λ DNA用固定ループプライマーを含むラテックス液を使用した場合。
- c.) M13 DNA用固定ループプライマーを含むラテックス液を使用した場合。

【図9】実施例2でλ DNA LAMP反応を行った反応液の可視光570nmの波長での濁度を測定した結果を示す図。増幅反応の進行に伴って形成されるピロリン酸マグネシウムによる濁度上昇分を差し引いたもの。

【図10】実施例3でλ DNA LAMP反応を行った反応液の可視光570nmの波長での濁度を測定した結果を示す図。

a.) 滅菌水 (DNA フリー) を試料とした場合。

b.) λ DNA (1x10⁵ 分子) を試料とした場合。

c.) M13 DNA (6x10⁵ 分子) を試料とした場合。

【図11】実施例3で増幅終了後の反応液を2%アガロースゲルにて電気泳動し、SYBR-Greenで染色した結果を示す図。

【図12】実施例4でλ DNA LAMP反応を行った反応液の可視光570nmの波長での濁度を測定した結果を示す図。

- a.) 未固定ループプライマーを使用した場合。
- b.) 未固定ループプライマー及び未感作ラテックス液を使用した場合。
- c.) 固定ループプライマーを含むラテックス液を使用した場合。

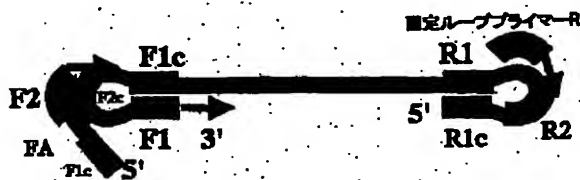
【図13】実施例4で増幅終了後の反応液を2%アガロースゲルにて電気泳動し、SYBR-Greenで染色した結果を示す図。

【図14】実施例5でλ DNA LAMP反応を行った反応液の可視光570nmの波長での濁度を測定した結果を示す図。

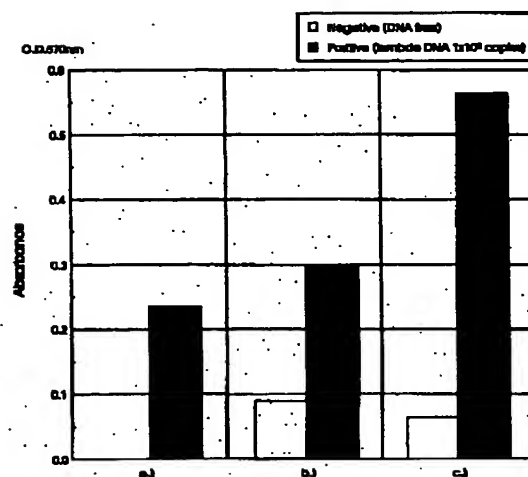
- a.) λ DNA 用固定Loop F を含むラテックス液を使用した場合。
- b.) λ DNA 用固定Loop R を含むラテックス液を使用した場合。
- c.) 上記 a.) および b.) の等量混合物を使用した場合。
- d.) λ DNA 用Loop F および λ DNA 用Loop R を混合して固定した固定ループプライマーを使用した場合。

【図15】実施例5で反応液中にエチジウムブロマイドをインターカラーターとして添加し、増幅速度をABI社7700を用いてそれぞれ確認を行った結果を示す図。

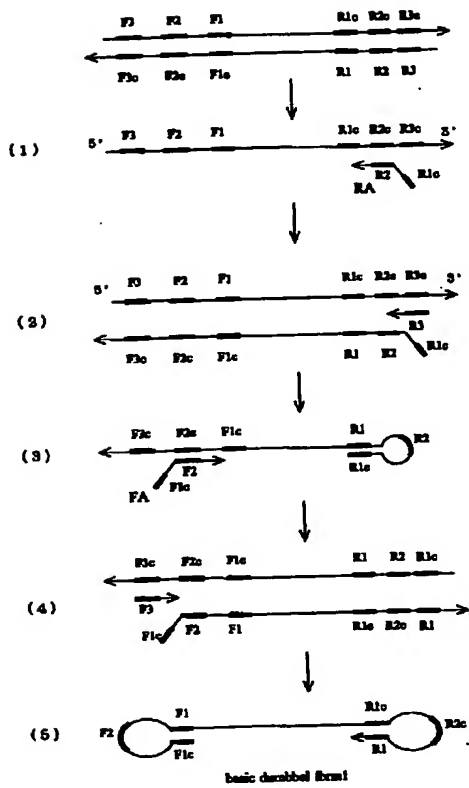
【図5】



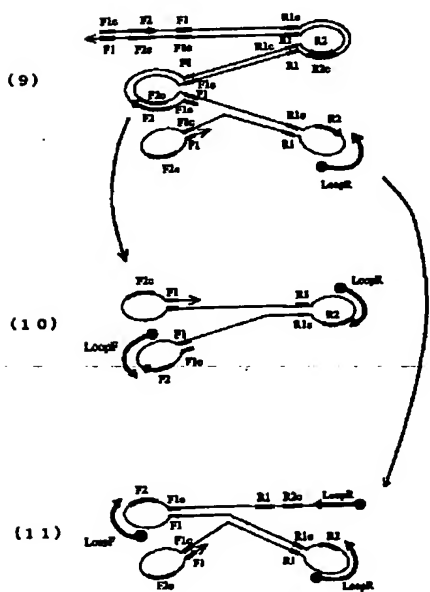
【図6】



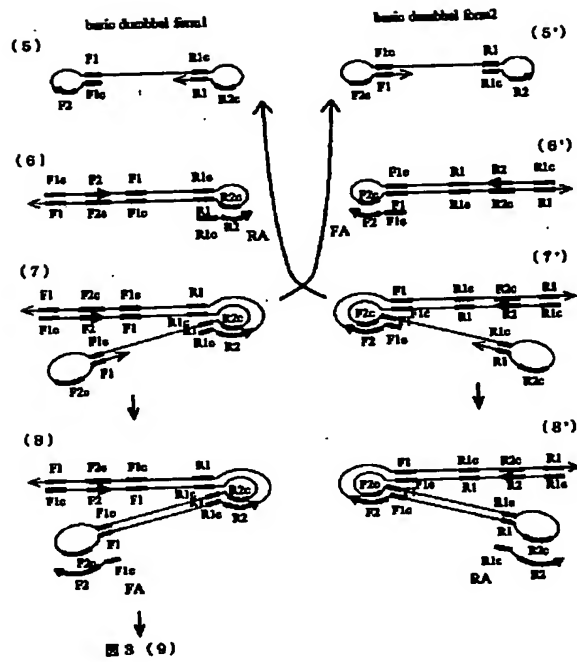
【図1】



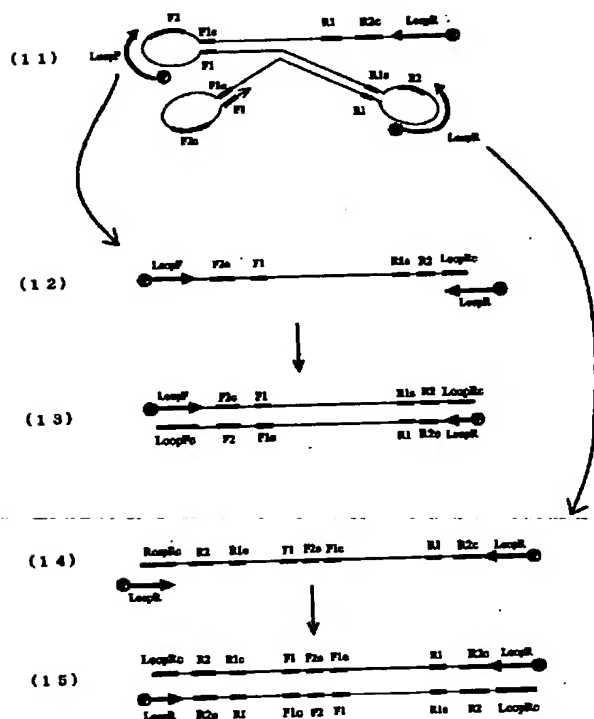
【図3】



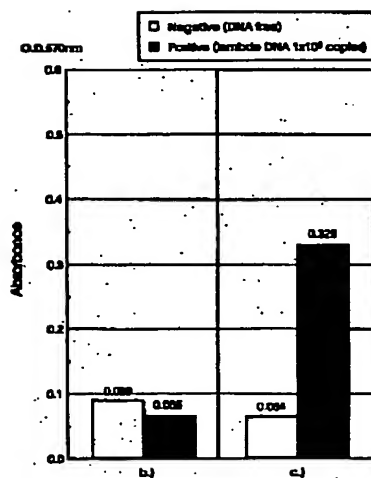
【図2】



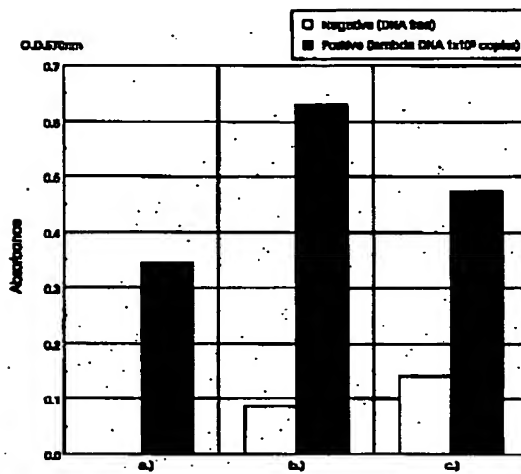
【図4】



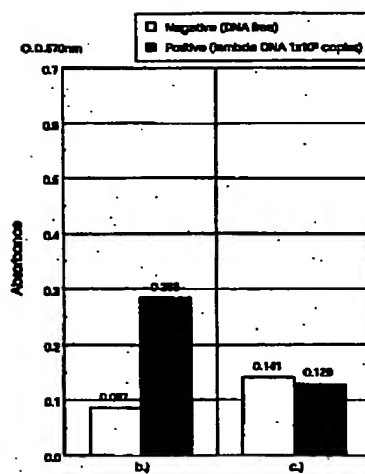
【図7】



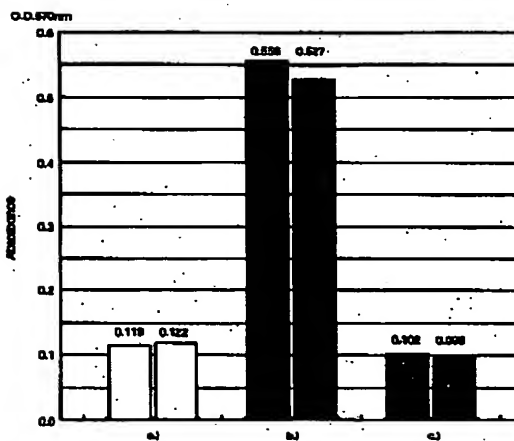
【図8】



【図9】



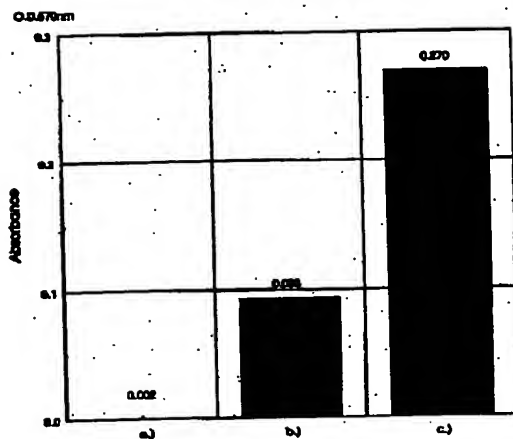
【図10】



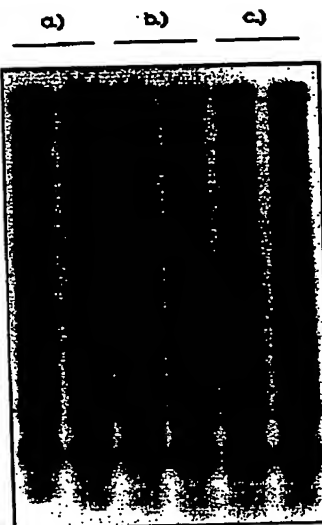
【図11】



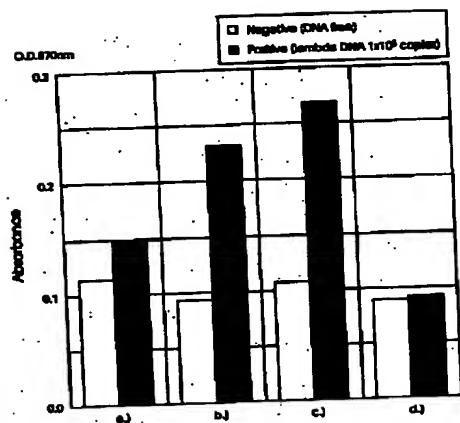
【図12】



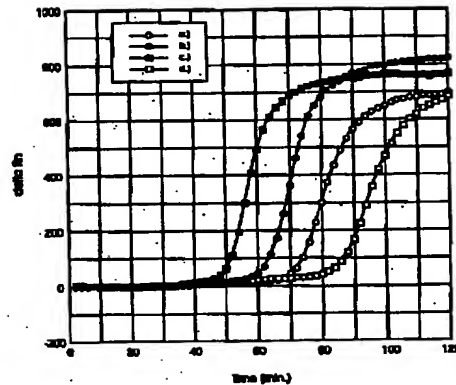
【図13】



【図14】



【図15】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 CA20
 HA08 HA14
 4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR08 QR13
 QR32 QR41 QR49 QR62 QR83
 QS24 QX01

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)
